

# *Az endomorfinek konformáció-analízise*

Doktori (PhD) értekezés

Leitgeb Balázs



Témavezető:  
Dr. Tóth Géza  
tudományos tanácsadó

Magyar Tudományos Akadémia  
Szegedi Biológiai Központ  
Biokémiai Intézet

Szeged, 2006.

## *Édesanyámnak és Édesapámnak*

*„Mind így van ezzel, aki hasonló időket megél, de a döntés nem rajta áll.  
Nekünk arról kell döntenünk, mihez kezdünk az idővel,  
amely számunkra megadatik.” - Szürke Gandalf (Mória bányáiban)*  
A gyűrűk ura - A gyűrű szövetsége

*„So do all who live to see such times, but that is not for them to decide.  
All we have to decide what to do with the time  
that is given for us.” - Gandalf the Grey (in the mines of Moria)*  
The lord of the rings - The fellowship of the ring



# Tartalomjegyzék

<b>1. Bevezetés</b>	6
1.1. Az endomorfinek	6
1.2. Az endomorfinek biológiai hatásai	7
1.3. Az endomorfinek térszerkezete	8
1.4. Célkitűzések	11
<b>2. Módszerek</b>	12
2.1. Elméleti háttér	12
2.1.1. Molekulamechanika	12
2.1.2. Energia-minimalizálás	13
2.1.3. Molekuladinamika	15
2.1.4. Szimulált anelláció	18
2.1.5. Random keresés	18
2.2. Felhasznált módszerek	20
2.2.1. Szimulált anelláció	20
2.2.2. Random keresés	21
2.2.3. Molekuladinamika	22
<b>3. Eredmények</b>	23
3.1. $\Phi$ - $\Psi$ konformációs terek	23
3.1.1. Ramachandran ábrák	23
3.1.2. Pszeudo-Ramachandran ábrák	28
3.1.3. 3D Ramachandran ábrák	29
3.1.4. 3D pszeudo-Ramachandran ábrák	31
3.1.5. Konformációs hasonlósági indexek	33
3.1.6. Parallel-koordinátás ábrák	37
3.2. Oldallánc rotamerek	38
3.3. Intramolekuláris távolságok	40
3.3.1. Molekulagerinc atomok közötti távolságok	40
3.3.2. Pszeudoatomok közötti távolságok	42
3.4. Intramolekuláris H-kötések	44
3.5. Másodlagos szerkezetek	50
3.6. Aromás-aromás kölcsönhatások	55
3.6.1. Aromás-aromás kölcsönhatások meghatározása	55
3.6.2. Tyr-Trp, Tyr-Phe, Trp-Phe és Phe-Phe kölcsönhatások	57
3.6.3. Oldallánc rotamer kombinációk	62
3.6.4. Aromás-aromás kölcsönhatások a másodlagos szerkezetekben	64
3.7. Prolin-aromás kölcsönhatások	65
3.7.1. Prolin-aromás kölcsönhatások meghatározása	65
3.7.2. Pro-Tyr, Pro-Trp és Pro-Phe kölcsönhatások	67
3.7.3. Oldallánc rotamerek	71
3.7.4. Prolin-aromás kölcsönhatások a másodlagos szerkezetekben	72
3.8. Molekuladinamikai szimulációk	72
<b>4. Konklúzió</b>	75
<b>5. Összefoglaló</b>	79
<b>6. Summary</b>	82
<b>7. Irodalomjegyzék</b>	85
Köszönetnyilvánítás	93

## Rövidítések jegyzéke

**AMBER:** Assisted Model Building and Energy Refinement

**AOT:** bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate sodium salt

**BFGS:** Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno

**cAMP:** ciklikus-adenozin-3',5'-foszfát

**CG:** Conjugate Gradient

**CHARMM:** Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics

**cisz-EM1:** EM1 (semleges/protonált N-terminális, *cisz* Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> peptidkötés)

**cisz-EM2:** EM2 (semleges/protonált N-terminális, *cisz* Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> peptidkötés)

**cisz-EMk:** EMk (semleges/protonált N-terminális, *cisz* Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> peptidkötés)

**cisz-H<sub>2</sub>N-EM1:** EM1 (semleges N-terminális, *cisz* Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> peptidkötés)

**cisz-H<sub>2</sub>N-EM2:** EM2 (semleges N-terminális, *cisz* Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> peptidkötés)

**cisz-H<sub>2</sub>N-EMk:** EMk (semleges N-terminális, *cisz* Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> peptidkötés)

**cisz-H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>-EM1:** EM1 (protonált N-terminális, *cisz* Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> peptidkötés)

**cisz-H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>-EM2:** EM2 (protonált N-terminális, *cisz* Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> peptidkötés)

**cisz-H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>-EMk:** EMk (protonált N-terminális, *cisz* Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> peptidkötés)

**CS:** Conformational Similarity

**DFF:** Davidson-Fletcher-Powell

**DG:** Distance Geometry

**DMSO:** dimetil-szulfoxid

**ECEPP:** Empirical Conformational Energy Program for Peptides

**EM1:** endomorfín-1

**EM2:** endomorfín-2

**EMk:** endomorfínok

**FF:** Force Field

**GROMOS:** GRoningen MOlecular Simulation

**LINCS:** LINear Constraint Solver

**MD:** Molecular Dynamics

**MD-SA:** Molecular Dynamics - Simulated Annealing

**MM:** Molecular Mechanics

**MS:** Murtaugh-Sargent

**NMR:** Nuclear Magnetic Resonance

**NPT:** izobár (konstans-nyomás, konstans-hőmérséklet) sokaság

**NVE:** mikrokanonikus (konstans-térfogat, konstans-energia) sokaság

**NVT:** kanonikus (konstans-térfogat, konstans-hőmérséklet) sokaság

**OPLS:** Optimized Potentials for Liquid Simulations

**PEF:** Potenciális Energia Felület

**PEHF:** Potenciális Energia HiperFelület

**PES:** Potential Energy Surface

**RMS:** Root Mean Square

**RS:** Random Search

**SA:** Simulated Annealing

**SD:** Steepest Descents

**SDS:** Sodium DodecylSulfate

***transz-EM1:*** EM1 (semleges/protonált N-terminális, *transz* Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> peptidkötés)

***transz-EM2:*** EM2 (semleges/protonált N-terminális, *transz* Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> peptidkötés)

***transz-EMk:*** EMk (semleges/protonált N-terminális, *transz* Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> peptidkötés)

***transz-H<sub>2</sub>N-EM1:*** EM1 (semleges N-terminális, *transz* Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> peptidkötés)

***transz-H<sub>2</sub>N-EM2:*** EM2 (semleges N-terminális, *transz* Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> peptidkötés)

***transz-H<sub>2</sub>N-EMk:*** EMk (semleges N-terminális, *transz* Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> peptidkötés)

***transz-H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>-EM1:*** EM1 (protonált N-terminális, *transz* Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> peptidkötés)

***transz-H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>-EM2:*** EM2 (protonált N-terminális, *transz* Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> peptidkötés)

***transz-H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>-EMk:*** EMk (protonált N-terminális, *transz* Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> peptidkötés)

**3DR:** three-dimensional (3D) Ramachandran

**3DPR:** three-dimensional (3D) Pseudo-Ramachandran



# 1. Bevezetés

## 1.1. Az endomorfinek

Az opioid peptidek számos jelentős farmakológiai hatással rendelkeznek, valamint a peptidek és receptoraik által alkotott komplex opioid rendszer sokféle fiziológiai folyamat szabályozásában vesz részt. Az endogén peptidek biológiai hatásaikat a membránhoz kötött receptorokhoz történő kapcsolódás révén fejtik ki. Farmakológiai vizsgálatok azt mutatták, hogy az opioid receptoroknak három fő típusa van:  $\mu$ ,  $\delta$  és  $\kappa$ . A receptorok típusainak azonosítását követően kezdték el keresni azokat az endogén ligandokat, amelyek nagy aktivitást és szelektivitást mutatnak ezekre a receptorokra vonatkozóan. A kezdeti időkben a  $\delta$ - és  $\kappa$ -receptorok esetén megtalálták az aktív és szelektív endogén opioid peptideket, azonban hosszú ideig nem tudták azonosítani a  $\mu$ -receptor endogén ligandját, amely nagy aktivitással és szelektivitással rendelkezik.

Zadina és mts. [1] 1997-ben két endogén peptidet izoláltak a szarvasmarha frontális kortexéből, amelyek  $\mu$ -opioid receptor agonistáknak bizonyultak. Ezek a peptidek különböztek a többi, addig ismert endogén opioid receptor ligandtól az N-terminális szekvenciájukban (Tyr-Pro), az amidált C-terminálisukban, valamint tetrapeptid méretükben. Mivel ezek a molekulák voltak az első olyan endogén peptidek, amelyek nagy aktivitást és szelektivitást mutattak a morfin által is preferált opioid receptorra vonatkozóan, így ezt a két tetrapeptidet endomorfín-1-nek (EM1, H-Tyr-Pro-Trp-Phe-NH<sub>2</sub>), illetve endomorfín-2-nek (EM2, H-Tyr-Pro-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>) nevezték el.

Az endomorfinek (EMk) nagy aktivitással kötődnek a  $\mu$ -opioid receptorhoz *in vivo* és *in vitro* (EM1:  $K_i = 0,36$  nM; EM2:  $K_i = 0,69$  nM) [1], ugyanakkor nagy szelektivitást is mutatnak erre a receptorra vonatkozóan. Az EM1 kb. 4000-szer jobban preferálja a  $\mu$ -receptort, mint a  $\delta$ -receptort, és kb. 15000-szer szelektívebb a  $\mu$ -receptorra, mint a  $\kappa$ -receptorra. Az EM2 kb. 13000-szer szelektívebb a  $\mu$ -receptoron, mint a  $\delta$ -receptoron, és kb. 7500-szor jobban preferálja a  $\mu$ -receptort, mint a  $\kappa$ -receptort [1].

Radioimmunológiai és immuncitokémiai vizsgálatok alapján megállapították, hogy az endomorfinek megtalálhatók az egér, a patkány, a tengerimalac, a szarvasmarha, a majom és az ember központi idegrendszerében. Ezek a peptidek különböző helyeken lokalizálódnak az emlősök szervezetében, így megtalálhatók a szarvasmarha kortexében [1], a patkány nyúltvelőjében és gerincvelőjében [2], továbbá előfordulnak a humán kortexben is [3]. A kezdeti radioimmunológiai vizsgálatok azt mutatták, hogy az EM1 főként a talamuszban, a hipotalamuszban, a kortexben és a striatumban található meg [1], ugyanakkor immuncitokémiai

vizsgálatok azt eredményezték, hogy az EM2 a nyúltvelőben és a gerincvelői dorzális ganglionokban fordul elő [2]. A későbbi radioimmunológiai vizsgálatok kimutatták, hogy az endomorfinek nemcsak a központi idegrendszerben lokalizálódnak, hanem megtalálhatók a patkány és az ember immunrendszerében is, ugyanis az EM1 és EM2 jelentős mennyiségét azonosították a patkány lépében és csecsemőmirigyében, valamint az ember lépében [4].

## 1.2. Az endomorfinek biológiai hatásai

Az endomorfinek számos jelentős biológiai hatással rendelkeznek az emlősök szervezetében [5], amelyek közül talán a legfontosabb a fájdalomérzékelés szabályozásában és a fájdalomcsillapításban betöltött szerepük [1,6,7]. Ezek a tetrapeptidok fiziológiai hatásait a  $\mu$ -opioid receptorhoz történő kapcsolódás során fejtik ki, így azokban az egerekben, amelyekben a  $\mu$ -opioid receptor nem fejeződik ki, az EM1 és EM2 nem okoz fájdalomcsillapító hatást [8].

Az endomorfinek komplex hatást mutatnak a vérkeringési rendszerben, ugyanis szerepet játszanak a véredények simaizom tónusának regulációjában, továbbá a véráramlás és a vérnyomás szabályozásában normális és magas vérnyomású állapotban egyaránt. Ezek a tetrapeptidok csökkentik az artériás nyomást, az artériás középnyomást és a szívfrekvenciát egérben [9], illetve az artériás nyomást, az artériás középnyomást, a perctérfogatot, a szívfrekvenciát és a teljes perifériás ellenállást patkányban [10,11,12], valamint az artériás nyomást nyúlban [13]. Ugyanakkor az endomorfinek macskában az artériás nyomás kezdeti növekedését eredményezik, amelyet aztán a nyomás csökkenése követ [14]. Az EM1 és EM2 tehát vazodepresszor [9,11,13,14] és vazodilatátor [10,15] aktivitással rendelkezik a kardiovaszkuláris rendszerben, illetve mindkét peptid hipotenziát idéz elő [12,13,16].

Az endomorfinek további biológiai hatásai közé tartozik a légzésdepresszió kiváltása [16], valamint a bélben történő szállítás és szekréció gátlása [7]. Emellett az EM1 és EM2 gátolja a szomatosztatin szekrécióját patkány gyomorban [17].

Az endomorfinek hatással vannak az ingerületátvivő anyagok szabadon bocsátására is, ugyanis ezek a tetrapeptidok a preszinaptikus  $\mu$ -opioid receptorok aktiválása révén a serkentő és/vagy gátló neurotranszmitterek kibocsátásának csökkenését eredményezik [18]. Az EM1 és EM2 gátolja az acetyl-kolin szabadon bocsátást a tengerimalac ileumában [19], valamint a tengerimalac és az ember tracheájában [20].

Az endomorfineknek immunmoduláló hatása is van. Egyrészt megváltoztatják a neutrofil sejtek természetes immunfunkcióit, ugyanis ezek a tetrapeptidok szabályozzák ezen sejtek szuperoxid anion termelését [21], gátolják a neutrofil

sejtek fibronectinhez történő adhézióját, elősegítik a neutrofil kemotaxist a kemoattraktánsztól függetlenül, valamint késleltetik a neutrofil apoptózist [22]. Másrészt az endomorfinek és a mikroglia közötti kölcsönhatás a mikroglia funkcióinak megváltozását eredményezi. Az EM1 és EM2 elősegíti a mikroglia általi szuperoxid anion termelést, valamint gátolja a mikroglia kemotaxist és a mikroglia általi fagocitózist [23].

A  $\mu$ -opioid receptor endomorfinek általi aktivációjának két nagy sejtszintű hatása van. Ezek közül az egyik a gátló hatás a cAMP/adeninil-cikláz útvonalon, ami a sejten belüli cAMP redukált szintjét eredményezi [24]. A másik a membránban található ioncsatornák szabályozása, így a  $K^+$  konduktancia növelése a  $K^+$ -csatornák aktiválása révén, valamint a  $Ca^{2+}$  konduktancia csökkentése. Mindkét ionkonduktanciájának megváltozása egyaránt a membrán ingerlékenység redukcióját okozza, és hozzájárul az EM1 és EM2 fájdalomcsillapító hatásához [24]. A preszinaptikus  $\mu$ -opioid receptorok endomorfinek általi aktiválása pedig redukálja a  $Ca^{2+}$  és/vagy növeli a  $K^+$  konduktanciát az axon végén [18].

### 1.3. Az endomorfinek térszerkezete

Mivel az endomorfinek jelentős biológiai hatásokkal rendelkeznek az emlősök szervezetében, ezért fontos, hogy felismerjük ezeknek a flexibilis tetrapeptideknek azon szerkezeti elemeit, amelyek szerepet játszanak a bioaktív konformáció kialakításában, és a receptorhoz kötődés során az aktivitás, valamint a szelektivitás kifejeződésében. Az eddigi munkákból az derült ki, hogy az endomorfinek esetén farmakofór elemnek tekinthető az N-terminális  $NH_2$  csoport, a Tyr aminosav az egyes pozícióban, továbbá egy aromás aminosav (Trp vagy Phe) a harmadik vagy a negyedik pozícióban. A Tyr-tól az aromás oldalláncú aminosavakat a kettes helyzetű Pro választja el, amely távtartóként funkcionál [25,26].

A *message-address* („üzenet-címzett”) koncepció [27] értelmében az opioid peptidek feloszthatók egy *message* szekvenciára, amely az N-terminális tri- vagy tetrapeptid egységnek felel meg, és egy *address* szekvenciára, amely a maradék C-terminális rész [28]. Ez a két szekvenciaszakasz játszik szerepet a receptorhoz kötődés során, valamint a receptor felismerésében. Az EM1 és EM2 esetében a lehetséges *message* fragmensek a  $Tyr^1-Pro^2-Trp^3$  és  $Tyr^1-Pro^2-Phe^3$  tripeptid egységek, míg az *address* fragmens a fennmaradó  $Phe^4-NH_2$  rész [29].

Az 1D  $^1H$  NMR mérések vízben és DMSO-ban egyaránt azt mutatták, hogy az EM1 *cisz* és *transz* izomer populációinak aránya 25 %/75 % [25], illetve 22 %/78 % [26].

Podlogar és mts. [25] az NMR mérések alapján vizes oldatban nem találtak intramolekuláris H-kötést az EM1 egyik izomere esetén sem, ezért a stabilis turn



struktúra kialakulását kizárták. Ugyanakkor a *transz* izomer esetén elvégzett 5 ns időtartamú molekuladinamikai szimuláció analízise alapján azt állapították meg, hogy a *transz*-EM1 konformerei két, stabil szerkezettel jellemezhető családra oszthatók fel, amelyek a Pro<sup>2</sup>  $\Psi$  és a Trp<sup>3</sup>  $\Phi$  torziós szögei alapján különíthetők el egymástól. Az egyik családba sorolható konformerek szerkezete hasonlít a III típusú  $\beta$ -turn struktúrához, amelyekben megfigyelhető egy intramolekuláris H-kötés a Tyr<sup>1</sup>-CO és a Phe<sup>4</sup>-NH csoportok között, és emellett még kialakulhat egy további H-kötés is a Pro<sup>2</sup>-CO és a C-terminális amid csoportok között. A kialakuló turn struktúra ellenére azonban a molekuladinamikai számítás során a peptid visszatérhet a nyújtott molekulagerinccel rendelkező konformációhoz az intramolekuláris H-kötések elvesztésével. Ezzel a nyújtott szerkezettel jellemezhető konformerek tartoznak a másik családba, amelyek a Pro<sup>2</sup>  $\Psi$  torziós szöge esetén 150°, és a Trp<sup>3</sup>  $\Phi$  torziós szöge esetén -120° karakterisztikus torziós szög értékekkel rendelkeznek. A *cisz*-EM1 esetén DMSO-ban találtak olyan konformációt, amelyben a Tyr<sup>1</sup>, Pro<sup>2</sup> és Trp<sup>3</sup> gyűrűk *stacking*-je figyelhető meg, kialakítva így egy ún. kompakt „szendvics” struktúrát, amelyben a Tyr<sup>1</sup> és Trp<sup>3</sup> aminosavak aromás oldalláncai két oldalról közrefogják a Pro<sup>2</sup> pirrolidin gyűrűjét. Ugyanakkor a vákuumban és vízben elvégzett molekuladinamikai szimulációk során a *cisz*-EM1 ezen konformációs sajátosságát nem észlelték. Az NMR mérések alapján a *transz*-EM1 esetén DMSO-ban szintén megfigyelhető a Tyr<sup>1</sup> és Pro<sup>2</sup> gyűrűk kölcsönhatása, azonban a Pro<sup>2</sup> és Trp<sup>3</sup> aminosavak között, valamint a Trp<sup>3</sup> és Phe<sup>4</sup> aminosavak aromás gyűrűi között nem találtak stabilizáló *stacking* kölcsönhatást. Podlogar és mts. [25] az EM1 DMSO oldatbeli konformációját összehasonlítva más szelektív  $\mu$ -opioid peptid ligandok szerkezetével, azt javasolták, hogy a *transz*-EM1 esetén a nyújtott molekulagerinccel rendelkező szerkezet a bioaktív konformáció.

Fiori és mts. [26] különböző körülmények között (vízben, SDS micellán és AOT micellán) vizsgálták az EM1 konformációs tulajdonságait és preferált konformereit. A *transz*-EM1 esetén NMR adatok alapján elvégzett DG (*distance geometry*) és MD-SA (*molecular dynamics-simulated annealing*) szimulációkból azt az eredményt kapták, hogy vízben az összes konformáció fő jellegzetessége a kissé hajlított szerkezet. Két konformer családot különböztettek meg, amelyek főképp a molekulagerinc hajlítottságának orientációjában tértek el egymástól, és ezen hajlított struktúrák esetén az N- és C-terminális végek közötti átlagos távolság 11 Å-nek adódott. A Tyr<sup>1</sup>, Trp<sup>3</sup> és Phe<sup>4</sup> aminosavak aromás oldalláncainak térbeli elrendeződése mindkét család összes konformere esetén hasonló képet mutatott, mely szerint a Tyr<sup>1</sup> és Phe<sup>4</sup> oldalláncok egymáshoz közel helyezkedtek el, míg a Trp<sup>3</sup> oldallánca meglehetősen flexibilisnek mutatkozott. A Tyr<sup>1</sup> és Phe<sup>4</sup> aromás oldalláncok térközelsége miatt feltételezték, hogy a közöttük kialakuló kölcsönhatás szerepet játszhat a *transz*-EM1 konformereinek stabilizálásában vizes

oldatban. A *cisz*-EM1 konformerei esetén ők is megfigyelték az ún. „szendvics” struktúrát, amelyben a Tyr<sup>1</sup> és Trp<sup>3</sup> aminosavak aromás gyűrűi a Pro<sup>2</sup> pirrolidin gyűrűjével alakítanak ki *stacking*-et, ugyanakkor ezt a kompakt szerkezetet a *transz*-EM1 konformerei esetén nem találták meg. Az NMR mérések alapján vizes oldatban nem figyeltek meg intramolekuláris H-kötést, és a konformerek között nem találtak definiált turn szerkezettel jellemezhető struktúrát. Az AOT micella esetén az EM1 mindkét izomerének szerkezete hajlított molekulagerinccel jellemezhető, aminek eredményeképpen az N- és C-terminális végek között mért átlagos távolság a *transz* izomernél 10 Å, míg a *cisz* izomernél 8 Å. A Tyr<sup>1</sup> és Trp<sup>3</sup> aminosavak aromás oldalláncai között mért 4,5 Å átlagos távolság azt mutatta, hogy az AOT micellán ezek az aromás gyűrűk szorosan illeszkednek egymáshoz a *cisz*-EM1 esetében. Ugyanakkor a Tyr<sup>1</sup> és Trp<sup>3</sup> aminosavak oldalláncainak térközeliségét nem figyelték meg a *transz*-EM1 esetén, és a két aromás oldallánc közötti átlagos távolság is nagyobbra adódott a *cisz* izomerrel összehasonlítva. Az SDS micella esetén az EM1 eltérő konformációját figyelték meg az AOT micellán tapasztalathoz viszonyítva, ugyanis ebben az esetben a peptid kevésbé kompakt struktúrát vesz fel, és a molekulagerinc is sokkal nyújtottabb szerkezetet mutat, mint az AOT micella esetén. Mindemellett az SDS micellán kialakuló szerkezet különbözött a vízben megfigyelt struktúrától is. Az aromás oldalláncok elhelyezkedése azonban hasonlított az AOT micellán megfigyelt elrendeződéshez, amelyben a Tyr<sup>1</sup> és Trp<sup>3</sup> aminosavak oldalláncai a molekulagerinc azonos oldalára mutatnak, míg a Phe<sup>4</sup> oldallánca a másik oldalon helyezkedik el.

Az EM2 esetén a 2D <sup>1</sup>H NMR mérések és a szimulált anelláció eredménye azt mutatta, hogy az egyensúlyi állapotban a Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> peptidkötésre vonatkozóan a *cisz*, illetve a *transz* izomerek aránya kb. 1:2 [29].

In és mts. [29] az NMR mérésekből származó proton-proton távolságkényszerekkel elvégzett szimulált anelláció és molekuladinamikai szimuláció alapján azt állapították meg, hogy a *transz*-EM2 konformereinek többsége nyújtott molekulagerincű szerkezettel jellemezhető, amely kissé meghajlik a Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup> rész mentén. A *cisz*-EM2 konformerei esetén szintén a nyújtott szerkezet a jellemző struktúra, azonban a Tyr<sup>1</sup> orientációja a Pro<sup>2</sup>-hoz viszonyítva különbözött a *transz* izomerben tapasztalttól. A *cisz*-EM1 konformereihez hasonlóan, a *cisz*-EM2 esetén is megfigyelték az ún. kompakt „szendvics” struktúrát, amelyet a Tyr<sup>1</sup>, Pro<sup>2</sup> és Phe<sup>3</sup> gyűrűk közötti *stacking* alakít ki.

A kezdeti eredmények alapján az EM1 és EM2 esetében tehát a *transz* izomer nyújtott molekulagerinccel jellemezhető konformerét tartják bioaktívnak, azonban emellett vannak más feltételezések is. Eguchi és mts. [30] biciklikus β-turn peptidomimetikumokra elvégzett 2D NMR mérések és molekulamechanikai számítások alapján azt javasolták, hogy az endomorfinek esetén a biológiailag aktív konfor-

mációs állapot a III típusú 1 $\leftarrow$ 4  $\beta$ -turn lehet. Ugyanakkor Keller és mts. [31] az EM2 pszeudoprolin tartalmú analógjainak vizsgálata alapján azt állították, hogy a tetrapeptid receptor-kötött konformációjában a Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> peptidkötés *cisz* állapotban van, vagyis a *cisz* izomer a bioaktív forma.

#### 1.4. Célkitűzések

Mivel az endomorfinek jelentős biológiai hatásokkal rendelkeznek az emlősök szervezetében, ezért fontos, hogy feltérképezzük ezen tetrapeptidek azon szerkezeti elemeit és konformációs tulajdonságait, amelyek hozzájárulnak a bioaktív konformáció kialakításához, valamint az aktivitás és szelektivitás kifejeződéséhez.

Az irodalmi áttekintés alapján látszik, hogy az endomorfinek különböző farmakológiai hatásait meglehetősen nagy részletességgel tanulmányozták, ugyanakkor ezen tetrapeptidek térszerkezetével kapcsolatosan eddig elég kevés eredmény látott napvilágot. Ezeknek a szerkezetvizsgálati munkáknak a többsége elsősorban NMR méréseken alapul, azonban az endomorfinek flexibilitása miatt a különböző szerkezeti tulajdonságok kísérleti módszerekkel történő meghatározása olykor nehézségekbe ütközik. Ebben az esetben nagyon jól alkalmazhatók a különböző molekulamodellezési módszerek és konformáció kereső algoritmusok, amelyek segítségével meghatározhatók a flexibilis peptidok különféle konformációs állapotai és térszerkezeti tulajdonságai. Mindemellett az irodalomban eddig közölt szerkezetvizsgálati munkák eredményei alapján meglehetősen eltérő javaslatok születtek az endomorfinek bioaktív konformációját illetően, tehát eléggé diffúz kép alakult ki arról, hogy milyen szerkezeti tulajdonságok teszik aktívvá ezeket az opioid peptidokat.

Mindezek figyelembevételével kutatásunk egyik céljaként tűztük ki, hogy részletesen feltérképezzük ezeknek a flexibilis tetrapeptideknek a konformációs tereit, valamint meghatározzuk az oldatban létező, illetve a preferált konformációs állapotait. További célként fogalmazódott meg, hogy azonosítsuk ezen peptidok jellegzetes másodlagos szerkezeti elemeit, valamint karakterizáljuk azokat az intramolekuláris kölcsönhatásokat, amelyek szerepet játszhatnak a különböző konformációs állapotok és másodlagos szerkezetek geometriájának stabilizálásában. Végül célul tűztük ki azt is, hogy megpróbáljuk azonosítani azokat a strukturális tulajdonságokat, másodlagos szerkezeti elemeket, illetve intramolekuláris kölcsönhatásokat, amelyek fontosak lehetnek az endomorfinek bioaktív konformációinak kialakításában, valamint a receptorhoz kötődés során az aktivitás és a szelektivitás kifejeződésében.



## 2. Módszerek

### 2.1. Elméleti háttér

#### 2.1.1. Molekulamechanika

Az erőter (*force field*, FF) módszerek vagy molekulamechanikai (*molecular mechanics*, MM) módszerek [32,33] az atommagok helyzetét vizsgálják úgy, hogy az elektronokat csak az általuk létesített erőter révén veszik figyelembe. Ez a Born-Oppenheimer közelítés alapján tehető meg, amely azt mondja ki, hogy egy molekula esetén a Schrödinger egyenletet két részre választhatjuk szét. Az egyik rész az elektronok mozgását, míg a másik rész az atommagok mozgását írja le, így az elektronok és az atommagok mozgását függetlenül tanulmányozhatjuk. Az erőter eljárás alapját egy mechanikai modell képezi, amely szerint a gömbökkel modellezett atomokat rugókkal reprezentált kötések kapcsolják össze. A molekulát felépítő atomok állandóan mozgásban vannak, és a mozgás következtében fellépő bármely szerkezeti változás a molekula energiájának megváltozását vonja maga után. Ezen energiaváltozások egyszerű erőtvények alapján kiszámíthatók, amennyiben az erőtvények alakja és a bennük szereplő erőállandók ismertek.

Egy általános molekulamechanikai erőteret a molekulában lévő intra- és intermolekuláris kölcsönhatásokat leíró négytagú kifejezéssel jellemezhetünk (potenciális energia egyenlet):

$$V = \sum V_{\text{kötésnyújtás}} + \sum V_{\text{szöghajlítás}} + \sum V_{\text{torzió}} + \sum V_{\text{nemkötő kölcsönhatások}}$$

$$\sum V_{\text{nemkötő kölcsönhatások}} = \sum V_{\text{vdW}} + \sum V_{\text{Coulomb}}$$

A molekulamechanikában használatos erőterekben alkalmazott energiatagok kötő és nemkötő jellegű kölcsönhatások leírására szolgálnak. A kötő kölcsönhatások közé tartoznak az egymással közvetlen kötésben lévő atomok között fellépő (1,2 vagy kötésnyújtási), a geminális (1,3 vagy kötéshajlítási) és a vicinális (1,4 vagy torziós) kölcsönhatások. Az egymáshoz közel lévő atomok között tapasztalható taszítás, és az egymástól távol lévő atomok között kialakuló diszperziós vonzás, valamint a töltések, a dipólusok és a kvadrupólusok egymásra hatásaként értelmezhető elektrosztatikus kölcsönhatások a nemkötő kölcsönhatások közé sorolhatók.

Az előbbi egyenletet felírhatjuk részletesebben a legáltalánosabban használt függvények alkalmazásával:

$$V(\mathbf{r}^N) = \sum_{\text{kötések}} \frac{k_i}{2} (l_i - l_{i,0})^2 + \sum_{\text{szögek}} \frac{k_i}{2} (\theta_i - \theta_{i,0})^2 + \sum_{\text{torziók}} \frac{V_n}{2} (1 + \cos(n\omega - \gamma))$$

$$+ \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N \left( 4\epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right)$$

Ezen egyenlet első tagja a kötésnyújtást, míg második tagja a szöghajlítást modellezi a Hooke törvény alkalmazásával. A harmadik tag a torziós szögek változását jellemzi, amely egy koszinusz függvényt tartalmazó kifejezés. A negyedik tag a nemkötő kölcsönhatásokból származó energiának felel meg, ahol általában a Lenard-Jones függvényt alkalmazzák a van der Waals kölcsönhatások, míg a Coulomb függvényt az elektrosztatikus kölcsönhatások modellezésére. A fent említett kötő és nemkötő kölcsönhatások esetén bizonyos erőterekben másfajta, adott esetben speciális függvényeket használnak a kölcsönhatásokból származó energiajárulékok pontosabb kiszámításához.

A molekulamechanikai erőterek mindemellett tartalmazhatnak további járulékos energiatagokat is. Ezek közé tartoznak a „nem valódi” (*improper*) torziók, valamint a síkból való kihajlás (*out-of-plane bending*) modellezésére alkalmas egyéb függvények. A belső koordináták közötti csatoltság figyelembe vehető a különböző kevert tagok (*cross terms*) használatával, amelyek többsége két belső koordináta függvénye (pl. nyújtás-nyújtás, *stretch-stretch*), de vannak három belső koordinátától függő kevert tagok is (pl. a nyújtás-nyújtás-hajlítás, *stretch-stretch-bend*). További járulékos energiatagként vehető figyelembe a polarizáció, és némely erőterek tartalmaznak explicit H-kötés tagot is.

A biomolekulák (peptidek, proteinek, nukleinsavak és szénhidrátok) esetén a leggyakrabban alkalmazott molekulamechanikai erőterek az AMBER (*Assisted Model Building and Energy Refinement*) [34], a CHARMM (*Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics*) [35], az ECEPP (*Empirical Conformational Energy Program for Peptides*) [36], a GROMOS (*GROningen MOLEcular Simulation*) [37] és az OPLS (*Optimized Potentials for Liquid Simulations*) [38] erőter.

### 2.1.2. Energia-minimalizálás

Ha az energia változását ábrázoljuk a belső koordináták függvényében, akkor egy változó esetén potenciálgörbét kapunk, két változó esetén potenciális energia felületről (PEF, *potential energy surface*, PES), több változó esetén pedig potenciális energia hiperfelületről (PEHF, *potential energy hypersurface*, PES) beszélünk.

A PEF jellegzetes pontjai a minimumok, a maximumok és a nyeregpontok (*saddle point*). A minimumokban található a molekula azon konformációi, amelyek megfelelnek a molekula stabilis állapotainak. A PEF-en nagyszámú minimum (lokális energiaminimum) fordulhat elő, és közülük a legkisebb energiával rendelkező a globális energiaminimum. Ezen minimumhelyeknek megfelelő konformációs állapotok meghatározásához használjuk a különböző minimalizálási algoritmusokat [39,40]. Ezek az eljárások iteratív módszerek, amelyekben az atomi koordináták változnak egyik iterációról a következőre, miközben az energia csökken. A minimumok, a maximumok és a nyeregpontok állandó pontok a PEF-en. Mindhárom pontban az energiafüggvény első deriváltja nulla az összes koordinátát figyelembevéve. A minimumban az energiafüggvény összes második deriváltja pozitív előjelű, a maximumban az összes második derivált negatív előjelű, míg a nyeregpontban van egy vagy több negatív előjelű második derivált.

A minimalizálási probléma formailag a következő: adott az  $f$  függvény, amely egy vagy több független változótól ( $x_1, x_2, \dots, x_i$ ) függ, és meg kell találni ezeknek a változóknak azon értékeit, ahol az  $f$  függvény értéke minimális. A leggyakrabban használt  $f$  függvény a molekulamechanikai módszerekkel kiszámítható potenciális energia ( $E$ ) az  $x_i$  változók függvényében, amelyek az atomok Descartes koordinátái vagy belső koordináták.

A minimalizálási algoritmusokat két csoportba oszthatjuk: az algoritmusok egyik része nem használja az energia deriváltjait, míg másik részük használja az energia deriváltjait (első és második deriváltak) az energia-minimalizálás során. A nem-derivált minimalizálási módszerek közé tartozik a szimplex módszer (*simplex method*) [41], amelyet gyakran használnak akkor, ha a molekula kiindulási konformációja nagy energiájú, illetve alkalmazzák más minimalizálási algoritmusokkal kombinálva, amikor az első néhány lépésben (iterációban) ezt a módszert használják a kiindulási szerkezet geometriájának finomítására (előoptimalizálás). A derivált minimalizálási módszereket az alapján csoportosíthatjuk, hogy milyen a legnagyobb rendű derivált, amit használnak. Az elsőrendű módszerek csak az első deriváltakat használják, míg a másodrendű módszerek az első és második deriváltakat is figyelembe veszik. A két leggyakrabban használt elsőrendű minimalizálási algoritmus a legmeredekebb csökkenés módszere (*steepest descents*, SD) [42] és a konjugált gradiens (*conjugate gradient*, CG) módszer. A legmeredekebb csökkenés módszere gyorsan konvergál, ha a deriváltak nagyok (a minimumtól távol), de lassan konvergál, ha a deriváltak kicsik (a minimum közelében). Ezt az algoritmust - a szimplex módszerhez hasonlóan - leggyakrabban előoptimalizálásra használják. A konjugált gradiens módszerek (Fletcher-Reeves [43], Polak-Ribiere [44], Hestenes-Stiefel [45], Powell [46]) jól alkalmazhatók nagy molekulák és modell rendszerek energia-minimalizálásához. A másodrendű minimalizálási módszerek



közé tartoznak a Newton-Raphson eljárások [39], amelyek elsősorban kis molekulák esetén alkalmazhatók. Ezek a módszerek gyorsan konvergálnak, ha a deriváltak kicsik (a minimum közelében), de lassan konvergálnak, ha a deriváltak nagyok (a minimumtól távol). A Newton-Raphson módszernek van néhány egyszerűbb változata, amelyek használatával nem szükséges a második deriváltakat tartalmazó Hess-mátrixot teljes egészében kiszámítani. Ezek közé tartoznak a kvázi-Newton módszerek (*quasi-Newton methods*): Davidson-Fletcher-Powell (DFP) [47], Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno (BFGS) [47] és Murtaugh-Sargent (MS) [40], valamint a blokk-diagonális Newton-Raphson módszer [40].

Mivel a legtöbb minimalizálási algoritmus örökké tartana folyamatosan közelebb és közelebb kerülve a minimumhoz, ezért a minimalizálás leállításához szükséges valamilyen küszöbérték (konvergencia kritérium) meghatározása, ha a számítás elegendően közel kerül a minimumhoz. Ennek eléréséhez többféle lehetőség áll rendelkezésre. Az egyik, hogy figyelemmel követjük az energia változását iterációról iterációra, és ebben az esetben a minimalizálásnak akkor van vége, ha az energiakülönbség az egymást követő lépések között egy előre megadott küszöbérték alá esik. Egy másik lehetőség a koordinátákban történő változás figyelemmel követése, és ennél az esetben akkor áll le a minimalizálás, ha a különbség az egymást követő konformációk koordinátái között elegendően kicsi. A harmadik módszer a gradiensek átlagos négyzetes eltéréseinek (*root mean square*, RMS) kiszámítása, amely esetben a minimalizálásnak akkor van vége, amikor egy iterációban a gradiens RMS értéke egy megadott küszöbérték alá esik.

### 2.1.3. Molekuladinamika

A molekuladinamika (*molecular dynamics*, MD) [48,49] a molekulák konformációjának változását vizsgálja az idő függvényében. A molekuladinamikában a molekula egymást követő konformációit a Newtoni mozgástörvény integrálásával kapjuk meg. Az integrálás eredménye a trajektória, amely pontosan meghatározza, hogyan változik a molekulában az atomok pozíciója és sebessége az idővel. A trajektóriát megkaphatjuk az alábbi differenciálegyenlet megoldásával Newton második törvénye ( $F = ma$ ) alapján:

$$\frac{d^2 \underline{r}_i}{dt^2} = \frac{\underline{F}_i}{m_i}$$

Ez az egyenlet leírja az  $m_i$  tömegű atom helyzetének változását ( $\underline{r}_i$ ), ahol  $\underline{F}_i$  az  $i$  atomra ható erő.

A molekuladinamikai szimulációk során különböző integrálási algoritmusokat alkalmazhatunk, azonban ezek közös jellemzője, hogy az integrálás sok kis

lépésben történik, és ezen lépések mindegyike egy állandó  $\delta t$  idővel van elválasztva egymástól. A molekula egy atomjára ható erő a  $t$  időpontban kiszámítható a többi atommal történő kölcsönhatás vektorösszegeként. Az erőből meghatározható az atomok gyorsulása, amit aztán kombinálva a pozíciókkal és a sebességekkel a  $t$  időpontban, kiszámíthatók a pozíciók és a sebességek a  $t + \delta t$  időpontban. Az erő állandó a  $\delta t$  lépésidő alatt. Az atomon ható erő az új pozícióban ismét meghatározható, ami az újabb pozíciókhoz és sebességekhez vezet a  $t + 2\delta t$  időpontban, és így tovább. A legáltalánosabban használt integrálási algoritmusok a Verlet- [50], a „bakugrás” - (*leap-frog*) [51], a velocity Verlet- [52] és a Beeman- [53] algoritmus.

Az integrálási algoritmus kiválasztásakor figyelembe kell venni az alkalmazott lépésidőt (*time step*). Ha a lépésidő túl kicsi, akkor a trajektória csak egy limitált részét fedi le a konformációs térnek, viszont ha a lépésidő túlságosan nagy, akkor instabilitások következhetnek be az integrálási algoritmusban, és a trajektória „felrobban”. Flexibilis molekulák szimulációja esetén a lépésidőt úgy kell beállítani, hogy az kb. a tizede legyen a legkisebb periódusú, legnagyobb frekvenciájú mozgásnak. A flexibilis molekulák esetén ezek a mozgások a kötésnyújtásoknak felelnek meg, főként a H-atommal kötésben lévő atomok kötéseire vonatkozóan. Mivel azonban ezek a nagy frekvenciájú mozgások általában minimális hatással vannak a molekulák nagy konformációs változásaira, így ezen vibrációk figyelmen kívül hagyhatók a megfelelő kényszerfeltételek (*restraint, constraint*) alkalmazásával. A leggyakrabban használt módszerek a kényszerfeltételek fenntartásához a SHAKE [54], a RATTLE [55] és a LINCS [56] algoritmusok. Ezen módszerek használata lehetővé teszi az alkalmazott lépésidő megnövelését a molekuldinamikai szimulációkban (pl. 1 fs-ről 2 fs-ra).

A molekuladinamikai számításnak két szakasza van: az egyensúlyi fázis és a produkciós fázis. Ha inhomogén rendszert (pl. egy peptid vizes oldatban) modellezünk, akkor általában részletesebb egyensúlyi szakaszra van szükség. Először az oldószerre és az ellenionokra (*counter ion*) energia-minimalizálást végzünk, mialatt az oldott anyagot sztérikusán rögzítve tartjuk a kiindulási konformációjában. Ezt követően az oldószer és az ellenionok együttesére molekuladinamikai szimulációt végzünk, amely során az oldott anyag térszerkezete ugyancsak rögzítve marad. A molekuladinamikai szimulációkban az egyensúlyi fázis hosszának nagyobbak kell lennie az oldószer relaxációs idejénél (pl. a víz relaxációs ideje kb. 10 ps). Ezután a teljes rendszerre (oldott anyag, oldószer és ellenionok) energia-minimalizálást végzünk, majd ezt követi a molekuladinamikai szimuláció, vagyis a produkciós fázis. A molekuladinamikai számítások során rendszeres időközönként (pl. minden 5-20 lépésidőben) eltároljuk az adott konformációra vonatkozó adatokat (pozíciók, sebességek és energiák), és így kapjuk meg a trajektóriát, amelyből a szimuláció elvégzése után meghatározhatjuk a molekula különböző szerkezeti tulajdonságait.

A molekuladinamikai szimulációkat különböző termodinamikai sokaságok használatával végezhetjük el [57,58]. A legáltalánosabban alkalmazott sokaságok a mikrokanonikus- (NVE, konstans-térfogat, konstans-energia), a kanonikus- (NVT, konstans-térfogat, konstans-hőmérséklet) és az izobár- (NPT, konstans-nyomás, konstans-hőmérséklet) sokaság, ahol  $N$  a részecskék száma,  $E$  az energia,  $T$  a hőmérséklet,  $V$  a térfogat és  $P$  a nyomás.

A molekuladinamikai számítások során használhatunk periodikus és nem-periodikus határfeltételeket. A periodikus határfeltételek alkalmazásakor a molekulákat tartalmazó doboz le van másolva a tér minden irányában, és ez adja a periodikus elrendeződést. Így ha egy molekula elhagyja a centrális dobozt a szimuláció során az egyik oldalon, akkor egy ugyanolyan molekula lép be a centrális dobozba az ellentétes oldalon, ezáltal a molekulák száma a centrális dobozban állandó marad. Különböző alakú dobozok, cellák alkalmazhatók a periodikus határfeltételek esetén: kocka, „csonkolt” oktaéder, hexagonális prizma, rombikus dodekaéder és „nyújtott” dodekaéder.

A molekuladinamikai szimuláció legidőigényesebb része a nemkötő kölcsönhatások kiszámítása, ugyanis ezeket a kölcsönhatásokat általában a rendszerben lévő összes atom között kiszámítjuk. A számítási idő csökkenthető egy ún. *cutoff* távolság használatával, ugyanis ebben az esetben csak azokat a nemkötő kölcsönhatásokat számítjuk ki, amelyek a *cutoff* értékén belül lévő atompárok között lépnek fel, míg a *cutoff* értékén kívül lévő atomokkal kialakuló kölcsönhatásokat nullának vesszük. A periodikus határfeltételek alkalmazásakor egy derékszögű cella esetén a *cutoff* nem lehet nagyobb, mint a doboz legkisebb oldalhosszának a fele. Ha olyan molekulákat modellezünk, amelyekben jelentős lehet az elektrosztatikus kölcsönhatásokból származó energiajárulék, akkor szükséges lehet különböző *cutoff*-ok használata az elektrosztatikus és a van der Waals kölcsönhatásokra. Ennek az az oka, hogy az elektrosztatikus kölcsönhatásoknak sokkal nagyobb a tartománya, mint a van der Waals kölcsönhatásoknak. Ebben az esetben két *cutoff* van meghatározva, az elektrosztatikus kölcsönhatások kiszámítására egy nagyobb *cutoff* érték, míg a van der Waals kölcsönhatásokra egy kisebb *cutoff* érték van megadva. A molekuladinamikai szimulációkban egy atom azon szomszédai, amelyek a *cutoff* távolságon belül vannak, nem változnak meg jelentősen 10 vagy 20 molekuladinamikai lépésidő alatt. Így ha tudjuk, hogy mely atomok tartoznak bele a nemkötő kölcsönhatások kiszámításába, akkor ezeket eltárolhatjuk egy „nemkötő szomszéd lista” (*non-bonding neighbour list*) alkalmazásával, és így nem kell kiszámítanunk az atomok közötti távolságokat minden egyes lépésidőben. Fontos azonban, hogy a „nemkötő szomszéd listát” a helyes frekvenciában frissítsük, vagyis adott lépésidőnként. Általában a „nemkötő szomszéd listát” 10-25 lépésidőnként frissítik.

#### 2.1.4. Szimulált anelláció

A szobahőmérsékleten elvégzett molekuladinamikai szimulációkkal általában nem lehetséges a teljes konformációs tér feltérképezése, hiszen ezen a hőmérsékleten a molekula nem képes átlépni a PEF nagyobb energiagátjait. Így ezen molekuladinamikai számítások során nem találjuk meg a PEF azon minimumhelyeit, amelyeket nagy energiagát választ el a kiindulási konformációtól. Egy lehetséges megoldása ennek a problémának, ha a molekuladinamikai szimulációt magas hőmérsékleten végezzük el, és így a molekula képes átlépni a nagy energiájú gátakat. A számítás során szabályos időközönként választjuk ki a trajektóriából a molekula különböző konformációit, amelyekre aztán energia-minimalizálást végezhetünk.

A PEF minimumainak pontosabb és hatékonyabb feltérképezése céljából dolgozták ki a szimulált anelláció (*simulated annealing*, SA) módszerét [59,60], amelynek lépései a következők. Az első lépés a fűtési szakasz (*heating phase*), amely során a rendszer hőmérsékletét növeljük azzal a céllal, hogy a PEF szobahőmérsékleten átléphetetlen energiagátjai fölé emeljük a molekulát. A második lépés az ekvibrálási szakasz (*equilibration phase*), amely során a molekuladinamikai számítást magas hőmérsékleten (kb. 1000-1500 K) végezzük el. Ebben a szakaszban a molekula szabadon mozoghat a PEF-en az energiagátak fölött, így a konformációs tér nagyobb része válik elérhetővé. A harmadik lépés a hűtési szakasz (*cooling phase*), amely során a hőmérsékletet jelentősen lecsökkentjük (kb. 50 K-re), és ezzel a molekulát belekényszerítjük a PEF valamelyik közeli energiaminimumába. A molekuladinamikai lépések (fűtési szakasz, ekvibrálási szakasz és hűtési szakasz) után a molekula geometriája tovább optimalizálható a megfelelő energia-minimalizálási módszerek használatával. A szimulált anelláció módszerében különböző időtartamú fűtési, ekvibrálási és hűtési szakaszok alkalmazhatók, valamint különböző hűtési típusok (exponenciális, lineáris, szigmoid és lépcsőzetes) állnak rendelkezésre.

A PEF energiaminimumainak kellő pontosságú feltérképezéséhez a fenti ciklust (fűtés, ekvibrálás, hűtés és energia-minimalizálás) többször (pl. százszor vagy ezerszer) meg kell ismételni, amely során a következő ciklus kiindulási konformációjának az előző ciklus eredményeképpen kapott szerkezetet választjuk. Kellően sok ciklus elvégzésével elérhetjük, hogy a PEF lehetséges minimumainak, illetve az ezeknek megfelelő konformációs állapotoknak a többségét feltérképezzük.

#### 2.1.5. Random keresés

A random keresés (*random search*, RS) módszerének [60] alkalmazása során a molekula konformációs terét egyrészt az atomok Descartes-koordinátáinak, más-

részt a molekula rotációra képes torziós szögeinek a megváltoztatásával térképezhetjük fel. Mindkét algoritmus hasonló megközelítést használ, ugyanis minden iterációs lépésben egy random változtatással generáljuk az új konformációt, amelynek a geometriáját aztán finomíthatjuk a megfelelő energia-minimalizálási módszerek alkalmazásával.

A random keresés két módszere abban különbözik egymástól, ahogyan az új konformációkat generálják. A Descartes-koordináta módszer [61,62] során random mennyiségeket adunk a molekulában lévő atomok  $x$ ,  $y$  és  $z$  koordinátaíhoz, míg a torziós szög módszer [63,64] esetén az új konformációkat úgy generáljuk, hogy random változtatásokat végzünk a rotációra képes torziós szögek értékeiben, mialatt a kötéstávolságok és a kötésszögek rögzítve maradnak. A torziós szög módszer alkalmazásakor lehetőség van a molekula összes torziós szögének egyidejű megváltoztatására, azonban általában csak egy vagy néhány torziós szög értéke változik meg egyidőben. A random változtatások következtében a generált konformációk nagy energiájúak lehetnek, és adott esetben a módszer eredményezhet meglehetősen torzult geometriákat is, ezért a random keresésből kapott konformációk esetén el kell végezni egy energia-minimalizálást. A két algoritmust összehasonlítva a torziós szög módszernek az az előnye, hogy jóval kevesebb szabadsági fokot vesz figyelembe, mint a Descartes-koordináta módszer.

A random keresés módszere egy iteratív eljárás, amely során több lehetőség is kínálkozik arra, hogy kiválasszuk a következő iteráció inputjaként szolgáló konformációt. Az egyik megközelítés az, hogy a kiindulási konformációt az előző iterációs lépésből nyerjük. Egy másik lehetőség, ha random módon választunk a korábban generált szerkezetek közül úgy, hogy a korábbi iterációkban legkevesebbszer választott szerkezetek nagyobb súllyal szerepelnek. A harmadik módszer a legkisebb energiájú konformáció alkalmazása kiindulási szerkezetként. Mindemellett a Metropolis Monte Carlo algoritmust is gyakran használják a kiindulási szerkezet megválasztásakor. Ebben az esetben az újonnan generált konformáció - az energia-minimalizálás után - elfogadható a következő iteráció kiindulási szerkezetének, ha az energiája kisebb, mint az előző iterációban kapott konformáció energiája. Amennyiben az új konformáció energiája nagyobb, akkor a Boltzmann faktort hasonlítjuk össze egy random számmal, amely 0 és 1 között változik. Ha a Boltzmann faktor nagyobb, mint egy random szám generátorral előállított szám, akkor az új szerkezet lesz a kiindulási konformáció a következő iteráció esetén.

A random keresés módszere gyorsítható, ha az adott iterációkban kapott torzult geometriával, illetve nagy szterikus energiával rendelkező konformációkat az algoritmus eleve kiszűri, és ezen szerkezetek esetén nem végez energia-minimalizálást. A többi optimalizált konformációt azonban a módszer eltárolja



úgy, hogy egyrészt kiszűri az azonos struktúrákat egy bizonyos nagyságú RMS küszöbérték alapján, másrészt megadható egy relatív energia *cutoff* érték is, amelyet a módszer szintén figyelembe vesz a különböző konformerek eltárolásakor.

Mivel a random keresésben az eljárásnak nincs egy meghatározott végpontja, ezért valamilyen kritérium segítségével kell megállítani a számolást, és erre többféle lehetőség adódik. Az egyik esetben addig generálunk szerkezeteket, amíg már nem kapunk új konformációt, míg a másik lehetőség, hogy a random keresés addig megy, amíg el nem éri a maximálisan megadott iteráció számot. Végül a keresés megállításához megadható egy olyan kritérium is, amely azt határozza meg, hogy egyfajta konformációt hányszor találhat meg maximálisan a módszer.

## 2.2. Felhasznált módszerek

### 2.2.1. Szimulált anelláció

A szimulált anellációkat AMBER erőter [34,65] felhasználásával készítettük el. Az oldószer hatását távolságfüggő dielektromos állandó ( $\epsilon = 4,5r$ ) beállításával közelítettük, és a nemkötő kölcsönhatások esetén nem használtunk *cutoff*-ot. Számításainkat az INSIGHT II programcsomag Discover 3 moduljával [66] végeztük el Silicon Graphics Origin2000 típusú számítógépen (Silicon Graphics, Inc.) Irix 6.5 operációs rendszer alatt.

A szimulált anelláció módszerének alkalmazásakor nyújtott molekulagerinccel rendelkező konformációból indultunk ki, amelynek a geometriáját egy rövid idejű energia-minimalizálással optimalizáltuk. Ezt követően a rendszert felmelegítettük 1000 fs alatt 1000 K hőmérsékletre, majd ezen a hőmérsékleten 4000 fs-ig ekvilibráltuk, és ezután 10000 fs alatt lehűtöttük 50 K hőmérsékletre. A hűtési szakaszban exponenciális hűtési típust alkalmaztunk. A molekuladinamikai szakaszokat egy újabb energia-minimalizálás követte, amely során három minimalizálási eljárást alkalmaztunk egymás után a konvergencia kritérium fokozatos finomításával. A legmeredekebb csökkenés módszerét egy konjugált gradiens eljárás (Polak-Ribiere) követte, majd végül egy módosított Newton-Raphson módszer (BFGS) következett. A gradiens konvergencia kritériumot az egymást követő energia-minimalizálási eljárásoknál egyre kisebbnek választottuk (SD:  $1000 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$ , CG:  $10 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$ , BFGS:  $0,001 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$ ). A fűtési, ekvilibrálni és hűtési szakaszokból, valamint a végső energia-minimalizálásból álló ciklust minden molekula esetén 1000-szer megismételtük, így minden egyes molekulára 1000 szerkezetet kaptunk eredményül.

Az endomorfinoakat az N-terminális amino-csoport semleges ( $\text{NH}_2$ -) illetve protonált ( $\text{NH}_3^+$ -) állapotának megfelelően kétféleképpen modelleztük. Utóbbi

esetben a pozitív töltés kompenzálására Cl<sup>-</sup>-elleniont használtunk, amelyre vonatkozóan megfelelő távolságkényszer alkalmaztunk. Az amino-terminális N-atom és a Cl<sup>-</sup>-ion távolságát 3,5 Å-nek választottuk meg a szimulációk során. Mivel az NMR adatok alapján az endomorfinek a Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> peptidkötés *cisz*, illetve *transz* állapotának megfelelő izomerek egyensúlyi keverékeként vannak jelen [25,26,29], ezért a szimulált anellációkat mindkét izomerre külön-külön elvégeztük a peptidkötés torziós szögéhez rendelt megfelelő kényszerfeltétel (*cisz*:  $\omega = 0^\circ$ , *transz*:  $\omega = 180^\circ$ ) alkalmazásával. Az N-terminális amino-csoport semleges, illetve protonált állapotának, valamint a Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> peptidkötés *cisz* és *transz* izomerének megfelelően az endomorfinek tehát négyféleképpen modelleztük.

### 2.2.2. Random keresés

A random kereséseket a SYBYL 6.9 programmal [67] készítettük el, és számításainkat szintén Silicon Graphics Origin2000 típusú számítógépen (Silicon Graphics, Inc.) Irix 6.5 operációs rendszer alatt végeztük. A számítások során az AMBER erőteret [65] használtuk, és távolságfüggő dielektromos állandó ( $\epsilon = 4,5r$ ) alkalmazásával modelleztük az oldószer hatását, valamint 15 Å *cutoff*-ot állítottunk be a nemkötő kölcsönhatások esetén.

A kiindulási nyújtott molekulagerinccel rendelkező konformációk esetében előoptimalizálást végeztünk egy háromlépéses energia-minimalizálási eljárás alkalmazásával, mely során az alábbi minimalizálási algoritmusokat és gradiens konvergencia kritériumokat alkalmaztuk: SD: 100 kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-1</sup>, CG: 1 kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-1</sup>, BFGS: 0,01 kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-1</sup>. Az előoptimalizálás után kapott konformációkra végeztük el a random kereséseket, amelyek során a molekulagerinc és az aminosav oldalláncok összes rotációra képes torziós szögét figyelembe vettük. A random keresés során a maximális iteráció számot 40000-re állítottuk be, ugyanakkor egy 7 kcal mol<sup>-1</sup> nagyságú relatív energia *cutoff*-ot is alkalmaztunk, továbbá az azonos szerkezetek kiszűrésére egy 0,2 Å nagyságú RMS küszöbértéket is beállítottunk. Az aminosavak kiralitását folyamatosan ellenőriztük a számítások során, hogy elkerüljük a királis centrumok inverzióját. A random kereséssel előállított konformációk esetén energia-minimalizálást végeztünk a Powell konjugált gradiens módszer alkalmazásával. Ebben az esetben a maximális iteráció számot 10000-re, míg a gradiens konvergencia kritériumot 0,005 kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-1</sup>-re állítottuk be.

A szimulált anellációhoz hasonlóan, az N-terminális amino-csoport semleges, illetve protonált állapotától, valamint a Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> peptidkötés *cisz* és *transz* természetétől függően négyféleképpen modelleztük az endomorfinek. A random keresésekből kapott konformerek száma a *transz*-H<sub>2</sub>N-EM1, *cisz*-H<sub>2</sub>N-EM1, *transz*-H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>-EM1 és *cisz*-H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>-EM1 esetén rendre 985, 514, 739 és 544, illetve a *transz*-

H<sub>2</sub>N-EM2, *cisz*-H<sub>2</sub>N-EM2, *transz*-H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>-EM2 és *cisz*-H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>-EM2 esetében rendre 988, 766, 998 és 529.

### 2.2.3. Molekuladinamika

A molekuladinamikai szimulációkat egyrészt az INSIGHT II programcsomag Discover 3 moduljával [66], másrészt a SYBYL 7.0 programmal [67] végeztük el Silicon Graphics Origin2000 típusú számítógépen (Silicon Graphics, Inc.) Irix 6.5 operációs rendszer alatt. Az endomorfinek különböző konformációs állapotait modelleztük az N-terminális amino-csoport állapotának, illetve a Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> peptid-kötésnél alkalmazott kényszerfeltételnek megfelelően.

Az explicit oldószer nélküli dinamikai számítások során AMBER erőteret [34,65] és távolságfüggő dielektromos állandót ( $\epsilon = 4,5r$ ) alkalmaztunk, továbbá a nemkötő kölcsönhatások tekintetében nem használtunk *cutoff*-ot. Ezen szimulációk esetén szintén nyújtott molekulagerinccel rendelkező konformációból indultunk ki, amelynek a geometriáját rövid ideig optimalizáltuk. Ezután következett a 10 ns időtartamú dinamikai szimuláció, amely során a lépésidőt 1 fs-nak választottuk, és a hőmérsékletet állandó értéken tartottuk ( $T = 300$  K). A molekuladinamikai számítások trajektóriái esetén 1 ps-os mintavételezést alkalmaztunk.

Az explicit vízzel elkészített dinamikai számítások során a korábban minimalizált szerkezeteket egy 30 Å oldalhosszúságú kocka alakú dobozba helyeztük, majd a dobozt feltöltöttük vízmolekulákkal SPC [68], illetve TIP3P [68] explicit vízmodell alkalmazásával. A szimulációkhoz AMBER erőteret [34,65,69] használtunk, és a dielektromos állandó értékét 1-re állítottuk be. Az ekvibrálás első szakaszában a peptidet sztérikusan megkötöttük, és az oldószerre végeztünk energia-minimalizálást. Ezt követően egy rövid idejű molekuladinamikai számítást futtattunk a vízmolekulákra (20 ps időtartam, 1 fs lépésidő, NVT sokaság, 300 K hőmérséklet), amely során a peptid még mindig sztérikusan rögzítve maradt. Az ekvibrálási szakasz utolsó lépéseként a peptid sztérikus megkötését feloldottuk, és a teljes rendszerre végeztünk energia-minimalizálást. Az ekvibrálást követően az 1 és 2 ns időtartamú molekuladinamikai szimulációkat NVT, illetve NPT sokaság (1 atm nyomás, 300 K hőmérséklet), valamint 1, illetve 2 fs lépésidő alkalmazásával készítettük el, és utóbbi esetben a SHAKE algoritmust használtuk a kényszerfeltételek fenntartásához. A nemkötő kölcsönhatások esetén 9,0 Å, illetve 9,5 Å *cutoff*-ot alkalmaztunk, valamint a „nemkötő szomszéd listát” 10, illetve 25 fs-onként frissítettük. Az explicit vizes molekuladinamikai számítások trajektóriáiból szintén 1 ps-onként vettünk mintát.

### 3. Eredmények

#### 3.1. $\Phi$ - $\Psi$ konformációs terek

##### 3.1.1. Ramachandran ábrák

Az endomorfinek  $\Phi$ - $\Psi$  konformációs tereinek jellemzésére, illetve a konformációs eloszlások meghatározására Ramachandran ábrákat készítettünk a Pro<sup>2</sup>, Trp<sup>3</sup>/Phe<sup>3</sup> és Phe<sup>4</sup> aminosavak  $\Phi$  és  $\Psi$  torziós szögeinek felhasználásával (1. ábra) [I,II]. A Ramachandran ábra az  $i$  aminosavra jellemző  $\Phi_i$  ( $C_{i-1}-N_i-C^{\alpha}_i-C_i$ ) és  $\Psi_i$  ( $N_i-C^{\alpha}_i-C_i-N_{i+1}$ ) torziós szögek alapján mutatja be a konformerek eloszlását a  $\Phi_i$ - $\Psi_i$  konformációs térben [70,71]. A Ramachandran ábrák esetén - összehasonlítási alapként - jelöltük a  $\Phi$ - $\Psi$  felszín konformációs tartományok (alterek) szerinti felosztását, amelyet védett aminosavak konformációs eloszlása alapján ECEPP számítások felhasználásával készítették el [72]. Ezen eloszlások alapján a teljes  $\Phi$ - $\Psi$  felszín egy „bal” félsíkra ( $-180^\circ < \Phi < 0^\circ$ ,  $-180^\circ < \Psi < 180^\circ$ ) és egy „jobb” félsíkra ( $0^\circ < \Phi < 180^\circ$ ,  $-180^\circ < \Psi < 180^\circ$ ) bontható, amelyek mindegyikét egyaránt nyolc-nyolc konformációs tartományra osztották fel. A „bal” félsík altereit A, B, C, D, E, F, G és H betűkkel, míg a „jobb” félsík altereit A\*, B\*, C\*, D\*, E\*, F\*, G\* és H\* betűkkel jelölték (2. ábra).

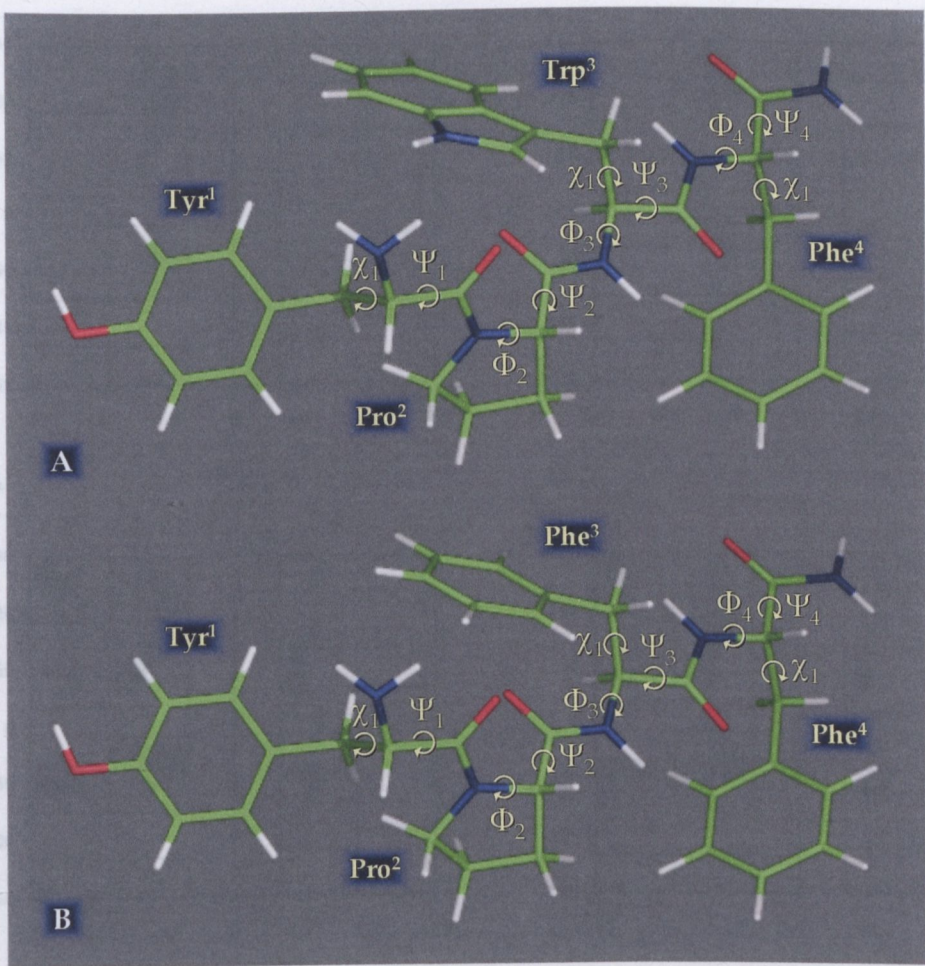
A *cisz*- és *transz*-EMk Pro<sup>2</sup>, Trp<sup>3</sup>/Phe<sup>3</sup> és Phe<sup>4</sup> aminosavaira vonatkozó  $\Phi_2$ - $\Psi_2$ ,  $\Phi_3$ - $\Psi_3$  és  $\Phi_4$ - $\Psi_4$  Ramachandran ábráinak (3. ábra) fent említett konformációs tartományaiban meghatároztuk a konformer populációk nagyságát (1. és 2. táblázat) [I,II].

A  $\Phi_2$ - $\Psi_2$  Ramachandran ábrákon a *transz*-H<sub>2</sub>N-EMk esetén az A, C és F tartományokban található a konformerek nagyrésze, míg a D, E és G, valamint az A\*, B\*, C\*, D\*, E\* F\*, G\* és H\* alterekben nem figyelhető meg konformer. A *cisz*-H<sub>2</sub>N-EMk esetében az A és F tartományok preferáltak, és a konformerek fennmaradó része a B és C alterekben lokalizálódik. A *transz*-H<sub>2</sub>N-EMk-hoz hasonlóan a D, E és G tartományok mellett, a csillaggal jelölt alterekben sem fordulnak elő konformerek.

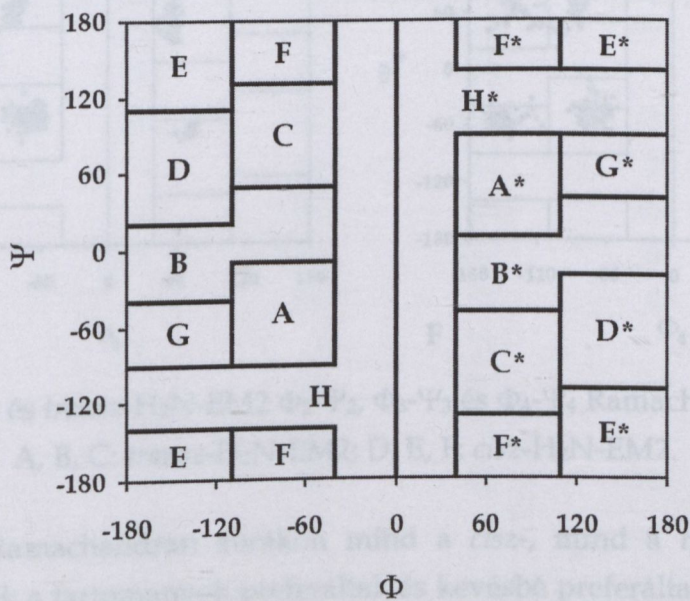
A  $\Phi_3$ - $\Psi_3$  Ramachandran ábrákon mind a *cisz*-, mind a *transz*-H<sub>2</sub>N-EMk esetén a konformerek többsége az A és C tartományokban található, ugyanakkor az E, F, G, A\* és C\* alterekben is vannak nagyobb konformer populációk. Mindkét izomer esetében az E\* és G\* alterek üresen maradnak.

A  $\Phi_4$ - $\Psi_4$  Ramachandran ábrákon a *cisz*- és *transz*-H<sub>2</sub>N-EMk esetén az A, C és E tartományokban helyezkedik el a konformerek nagyrésze, míg a H, B\*, D\*, E\* és G\* alterekben nem fordulnak elő konformerek. Ugyanakkor mindkét izomernél található nagyobb populációk a D, F, G, A\* és C\* tartományokban is.



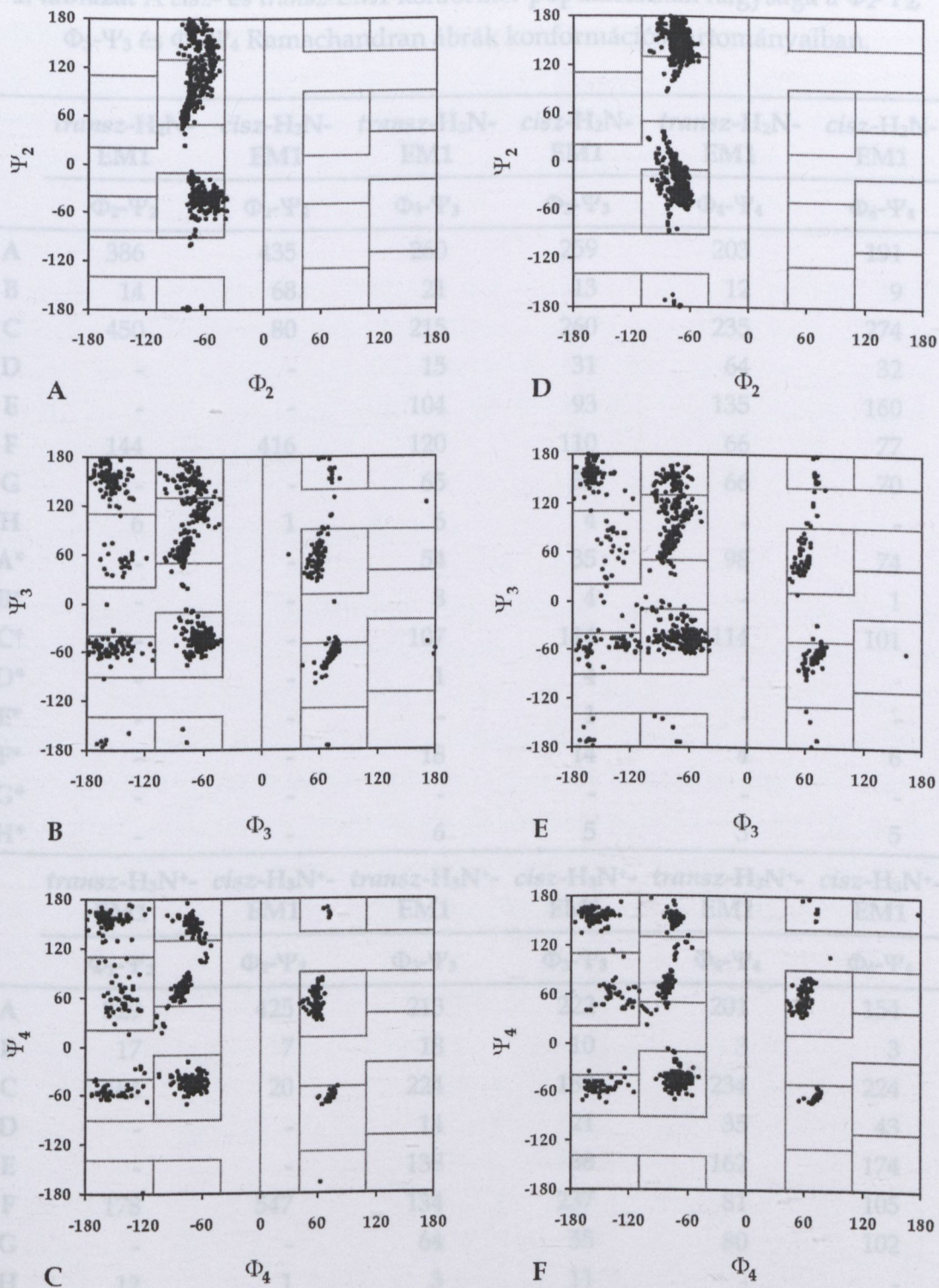


1. ábra Az EM1 és EM2 Tyr<sup>1</sup>, Pro<sup>2</sup>, Trp<sup>3</sup>/Phe<sup>3</sup> és Phe<sup>4</sup> aminosavainak  $\Phi$ ,  $\Psi$  és  $\chi$  torziós szögei. A: EM1; B: EM2.



2. ábra A  $\Phi$ - $\Psi$  felszín konformációs tartományok szerinti felosztása.





3. ábra A *cis*- és *transz*-H<sub>2</sub>N-EM2  $\Phi_2$ - $\Psi_2$ ,  $\Phi_3$ - $\Psi_3$  és  $\Phi_4$ - $\Psi_4$  Ramachandran ábrái.

A, B, C: *transz*-H<sub>2</sub>N-EM2; D, E, F: *cis*-H<sub>2</sub>N-EM2.

A  $\Phi_2$ - $\Psi_2$  Ramachandran ábrákon mind a *cis*-, mind a *transz*-H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>-EMk esetén ugyanazok a tartományok preferáltak és kevésbé preferáltak, mint a *cis*- és *transz*-H<sub>2</sub>N-EMk esetében. Ezeknél a molekuláknál szintén nem található konformer a D, E és G alterekben, valamint a csillaggal jelölt tartományokban.

1. táblázat A *cisz*- és *transz*-EM1 konformer populációinak nagysága a  $\Phi_2$ - $\Psi_2$ ,  $\Phi_3$ - $\Psi_3$  és  $\Phi_4$ - $\Psi_4$  Ramachandran ábrák konformációs tartományában.

	<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N- EM1	<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N- EM1	<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N- EM1	<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N- EM1	<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N- EM1	<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N- EM1
	$\Phi_2$ - $\Psi_2$	$\Phi_2$ - $\Psi_2$	$\Phi_3$ - $\Psi_3$	$\Phi_3$ - $\Psi_3$	$\Phi_4$ - $\Psi_4$	$\Phi_4$ - $\Psi_4$
A	386	435	260	259	203	191
B	14	68	21	13	12	9
C	450	80	215	260	235	274
D	-	-	15	31	64	32
E	-	-	104	93	135	160
F	144	416	120	110	66	77
G	-	-	65	53	66	70
H	6	1	6	4	-	-
A*	-	-	54	35	98	74
B*	-	-	8	4	-	1
C*	-	-	107	114	114	101
D*	-	-	1	4	-	-
E*	-	-	-	1	-	-
F*	-	-	18	14	4	6
G*	-	-	-	-	-	-
H*	-	-	6	5	3	5

	<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> - EM1	<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> - EM1	<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> - EM1	<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> - EM1	<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> - EM1	<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> - EM1
	$\Phi_2$ - $\Psi_2$	$\Phi_2$ - $\Psi_2$	$\Phi_3$ - $\Psi_3$	$\Phi_3$ - $\Psi_3$	$\Phi_4$ - $\Psi_4$	$\Phi_4$ - $\Psi_4$
A	329	425	213	222	201	154
B	17	7	18	10	3	3
C	464	20	224	180	234	224
D	-	-	14	21	35	43
E	-	-	138	88	162	174
F	178	547	134	237	81	105
G	-	-	64	55	80	102
H	12	1	3	11	-	-
A*	-	-	58	34	87	87
B*	-	-	7	5	-	1
C*	-	-	93	92	105	76
D*	-	-	3	1	-	-
E*	-	-	-	1	-	-
F*	-	-	22	34	7	27
G*	-	-	-	-	-	-
H*	-	-	9	9	5	4

2. táblázat A *cisz*- és *transz*-EM2 konformer populációinak nagysága a  $\Phi_2$ - $\Psi_2$ ,  $\Phi_3$ - $\Psi_3$  és  $\Phi_4$ - $\Psi_4$  Ramachandran ábrák konformációs tartományaiban.

	<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N- EM2	<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N- EM2	<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N- EM2	<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N- EM2	<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N- EM2	<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N- EM2
	$\Phi_2$ - $\Psi_2$	$\Phi_2$ - $\Psi_2$	$\Phi_3$ - $\Psi_3$	$\Phi_3$ - $\Psi_3$	$\Phi_4$ - $\Psi_4$	$\Phi_4$ - $\Psi_4$
A	388	426	223	232	200	227
B	8	76	23	25	16	16
C	466	63	212	279	260	242
D	-	-	26	29	54	45
E	-	-	128	114	127	135
F	152	435	95	86	95	72
G	-	-	80	56	60	83
H	6	-	1	4	-	-
A*	-	-	72	53	92	98
B*	-	-	6	4	1	-
C*	-	-	104	92	87	74
D*	-	-	3	1	-	-
E*	-	-	-	-	-	1
F*	-	-	17	17	8	6
G*	-	-	-	-	-	-
H*	-	-	10	8	-	1

	<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> - EM2	<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> - EM2	<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> - EM2	<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> - EM2	<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> - EM2	<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> - EM2
	$\Phi_2$ - $\Psi_2$	$\Phi_2$ - $\Psi_2$	$\Phi_3$ - $\Psi_3$	$\Phi_3$ - $\Psi_3$	$\Phi_4$ - $\Psi_4$	$\Phi_4$ - $\Psi_4$
A	334	414	235	206	211	162
B	7	16	26	16	2	3
C	430	26	243	223	243	207
D	-	-	17	26	57	49
E	-	-	109	110	131	150
F	221	537	88	179	81	115
G	-	-	62	40	68	103
H	8	7	1	3	-	-
A*	-	-	63	51	94	87
B*	-	-	7	1	-	-
C*	-	-	112	98	100	101
D*	-	-	7	1	-	-
E*	-	-	1	-	-	-
F*	-	-	24	31	11	21
G*	-	-	-	-	-	-
H*	-	-	5	15	2	2

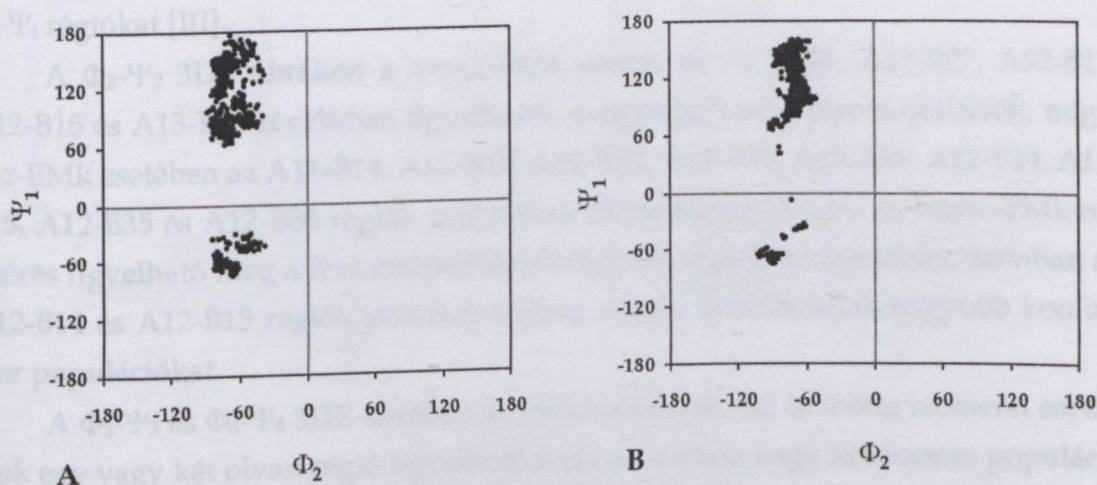


A  $\Phi_3$ - $\Psi_3$  Ramachandran ábrákon a *transz*- $H_3N^+$ -EMk esetén - a *transz*- $H_2N$ -EMk-hoz hasonlóan - a konformerek többsége az A és C tartományokban helyezkedik el, ugyanakkor az E, F, G, A\* és C\* alterekben is vannak nagyobb konformer populációk. A *cisz*- $H_3N^+$ -EMk esetében a konformerek nagyrésze az A, C és F tartományokban lokalizálódik, és szintén megfigyelhetők nagyobb populációk az E, G, A\* és C\* alterekben. Mindkét izomer esetén üresen maradnak az E\* és G\* tartományok.

A  $\Phi_4$ - $\Psi_4$  Ramachandran ábrákon a *cisz*- és *transz*- $H_3N^+$ -EMk esetében szintén ugyanazok a tartományok preferáltak, mint a *cisz*- és *transz*- $H_2N$ -EMk-nál. Mindemellett mindkét izomer esetén megfigyelhetők nagyobb konformer populációk a D, F, G, A\* és C\* alterekben, míg a H, B\*, D\*, E\* és G\* tartományok ebben az esetben is üresen maradnak.

### 3.1.2. Pszeudo-Ramachandran ábrák

Az endomorfinek N-terminális Tyr<sup>1</sup> aminosava esetén nem lehet  $\Phi$  torziós szöget definiálni, ezért a Tyr<sup>1</sup> konformációs terének jellemzésére pszeudo-Ramachandran ábrákat készítettünk. Míg a konvencionális Ramachandran ábrát az *i* aminosavra karakterisztikus  $\Phi_i$  és  $\Psi_i$  torziós szögek felhasználásával készítjük el, addig a pszeudo-Ramachandran ábrán az *i* aminosav  $\Phi_i$  torziós szögének, valamint az *i-1* aminosav  $\Psi_{i-1}$  torziós szögének megfelelő konformációs eloszlást ábrázoljuk. Ennek alapján a  $\Phi_2$ - $\Psi_1$  pszeudo-Ramachandran ábrákat (4. ábra) a Pro<sup>2</sup>  $\Phi_2$  torziós szögének, illetve a Tyr<sup>1</sup>  $\Psi_1$  torziós szögének felhasználásával készítettük el (1. ábra).



4. ábra A *cisz*- és *transz*- $H_2N$ -EM2  $\Phi_2$ - $\Psi_1$  pszeudo-Ramachandran ábrái.

A: *transz*- $H_2N$ -EM2; B: *cisz*- $H_2N$ -EM2.

A *transz*-EMk esetén a konformerek szinte azonos eloszlást mutatnak a  $\Phi_2$ - $\Psi_1$  pszeudo-Ramachandran ábrákon, ugyanakkor a *cisz*-EMk esetében tapasztalható konformációs eloszlások is nagy hasonlóságot mutatnak. Mindkét izomernél megfigyelhető, hogy a konformerek többsége a  $\Phi_2$ - $\Psi_1$  pszeudo-Ramachandran ábrák bal felső negyedében ( $-180^\circ < \Phi < 0^\circ$ ,  $0^\circ < \Psi < 180^\circ$ ) lokalizálódik, azonban az endomorfinek két izomere tekintetében kissé eltérő eloszlásokat kapunk, és a *cisz*-EMk kompaktabb konformációs eloszlással jellemezhetők a *transz*-EMk-hoz képest.

### 3.1.3. 3D Ramachandran ábrák

A háromdimenziós Ramachandran (3DR) ábrák jobban szemléltetik a konformációs eloszlásokat, mint a konvencionális Ramachandran ábrák, ugyanis ebben az esetben a  $\Phi$ - $\Psi$  síkra merőleges  $z$  tengelyen ábrázolható a konformer populációk nagysága [73]. A 3DR ábrákat - a Ramachandran ábrákhoz hasonlóan - az endomorfinek Pro<sup>2</sup>, Trp<sup>3</sup>/Phe<sup>3</sup> és Phe<sup>4</sup> aminosavai esetén készítettük el a megfelelő  $\Phi$  és  $\Psi$  torziós szögek felhasználásával (1. ábra) [III]. A 3DR ábrák elkészítésekor az  $i$  aminosav  $\Phi_i$  és  $\Psi_i$  torziós szögeinek  $-180^\circ$ -tól  $180^\circ$ -ig terjedő tartományait felosztottuk  $10^\circ$ -os intervallumokra, és így  $36 \times 36$  régiót kaptunk a  $\Phi_i$ - $\Psi_i$  felszínen. A  $\Phi_i$  torziós szögre vonatkozó 36 régiót A1-A36-tal jelöltük  $-180^\circ$ -tól  $180^\circ$ -ig, míg a  $\Psi_i$  torziós szög 36 régióját B1-B36-tal jelöltük a  $-180^\circ$ -tól  $180^\circ$ -ig terjedő tartományban. Ezekben a  $10^\circ \times 10^\circ$ -os konformációs régiókban meghatároztuk a konformer populációk nagyságát, amelyeket aztán ábráztunk a  $\Phi_i$ - $\Psi_i$  síkot meghatározó torziós szögek függvényében.

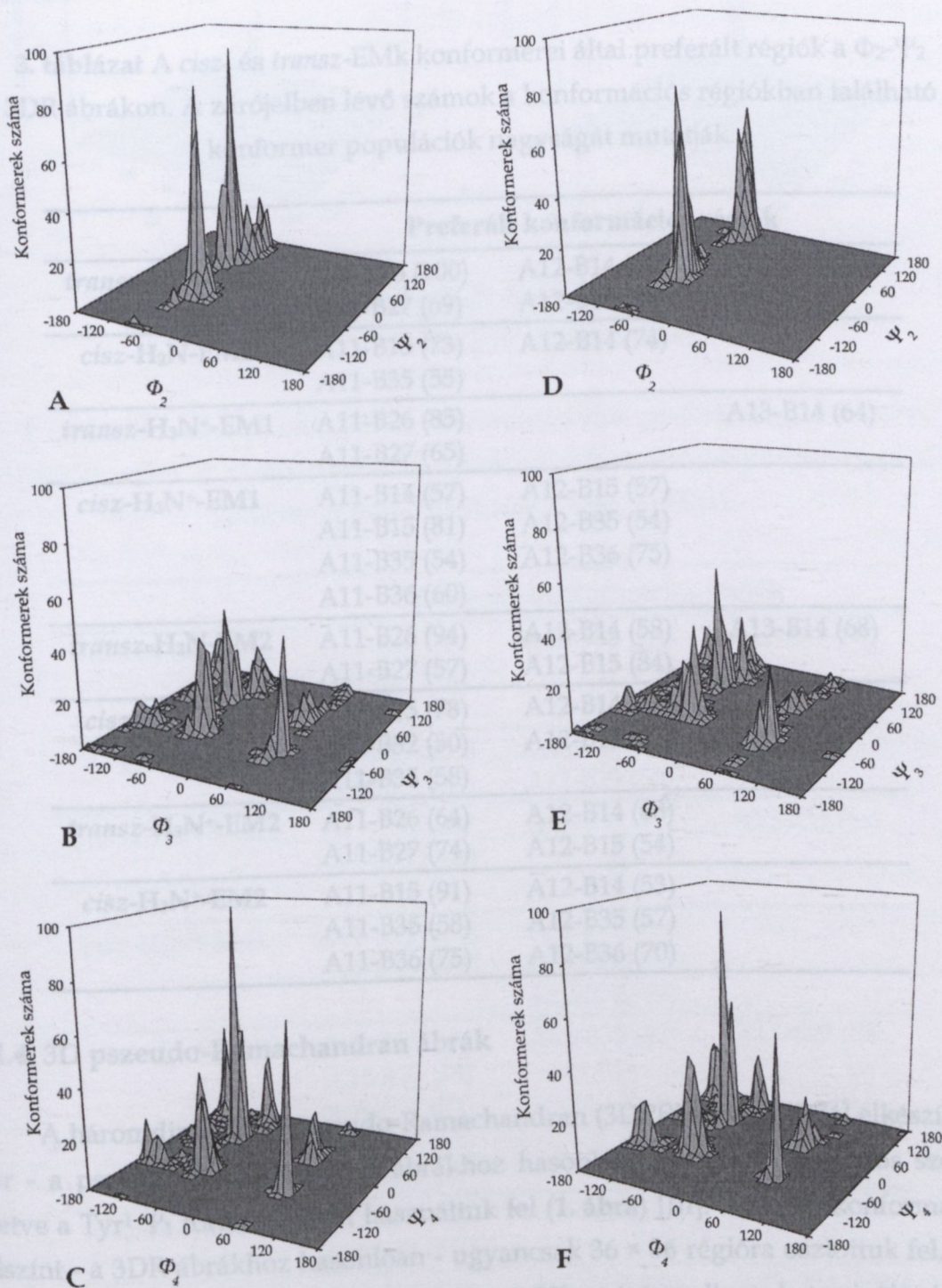
A *cisz*- és *transz*-EMk Pro<sup>2</sup>, Trp<sup>3</sup>/Phe<sup>3</sup> és Phe<sup>4</sup> aminosavaira vonatkozó  $\Phi_2$ - $\Psi_2$ ,  $\Phi_3$ - $\Psi_3$  és  $\Phi_4$ - $\Psi_4$  3DR ábrákon (5. ábra) meghatároztuk a konformerek által preferált  $\Phi_i$ - $\Psi_i$  régiókat [III].

A  $\Phi_2$ - $\Psi_2$  3DR ábrákon a *transz*-EMk esetén az A11-B26, A11-B27, A12-B14, A12-B15 és A13-B14 régiókban figyelhetők meg nagy konformer populációk, míg a *cisz*-EMk esetében az A11-B14, A11-B15, A11-B32, A11-B35, A11-B36, A12-B14, A12-B15, A12-B35 és A12-B36 régiók preferáltak (3. táblázat). A *cisz*- és *transz*-EMk-nál eltérés figyelhető meg a fent említett konformációs régiók tekintetében, azonban az A12-B14 és A12-B15 régiók mindkét izomer esetén tartalmaznak nagyobb konformer populációkat.

A  $\Phi_3$ - $\Psi_3$  és  $\Phi_4$ - $\Psi_4$  3DR ábrákon az endomorfinek *cisz* és *transz* izomerei esetén csak egy vagy két olyan régió figyelhető meg, amelyben nagy konformer populáció található. Ennek oka pedig az, hogy a Trp<sup>3</sup>/Phe<sup>3</sup> és Phe<sup>4</sup> aminosavak esetén a Pro<sup>2</sup>-hoz képest nagyobb a konformációs tér betöltöttsége, vagyis ebben az esetben a konformerek a  $\Phi_i$ - $\Psi_i$  felszín „jobb” félsíkjának ( $0^\circ < \Phi < 180^\circ$ ,  $-180^\circ < \Psi < 180^\circ$ ) a régióiban is előfordulhatnak. A  $\Phi_3$ - $\Psi_3$  3DR ábrákon a *cisz*-EMk esetén a konforme-



rek nagyobb populációi figyelhetők meg az A10-B25 régióban, míg a  $\Phi_4$ - $\Psi_4$  3DR ábrákon a *cis*- és *transz*-EMk esetében az A10-B25 és A26-B12 régiókban lokalizálódnak nagy konformer populációk.



**5. ábra** A *cis*- és *transz*-H<sub>2</sub>N-EM2  $\Phi_2$ - $\Psi_2$ ,  $\Phi_3$ - $\Psi_3$  és  $\Phi_4$ - $\Psi_4$  3DR ábrái.

A, B, C: *transz*-H<sub>2</sub>N-EM2; D, E, F: *cisz*-H<sub>2</sub>N-EM2.

A  $\Phi_2$ - $\Psi_2$ ,  $\Phi_3$ - $\Psi_3$  és  $\Phi_4$ - $\Psi_4$  3DR ábrákon a *transz*-EMk konformerei nagyjából azonos eloszlásokat mutatnak, míg ezen 3DR ábrákon a *cisz*-EMk esetén is hasonló

konformációs eloszlások figyelhetők meg. Az endomorfinok két izomere tekintetében azonban a  $\Phi_2$ - $\Psi_2$  3DR ábrákon tapasztalhatók különbségek, ugyanakkor a  $\Phi_3$ - $\Psi_3$  és  $\Phi_4$ - $\Psi_4$  3DR ábrák nagyjából ugyanazt az eloszlást mutatják a két izomerre vonatkozóan.

**3. táblázat** A *cisz*- és *transz*-EMk konformerei által preferált régiók a  $\Phi_2$ - $\Psi_2$  3DR ábrákon. A zárójelben lévő számok a konformációs régiókban található konformer populációk nagyságát mutatják.

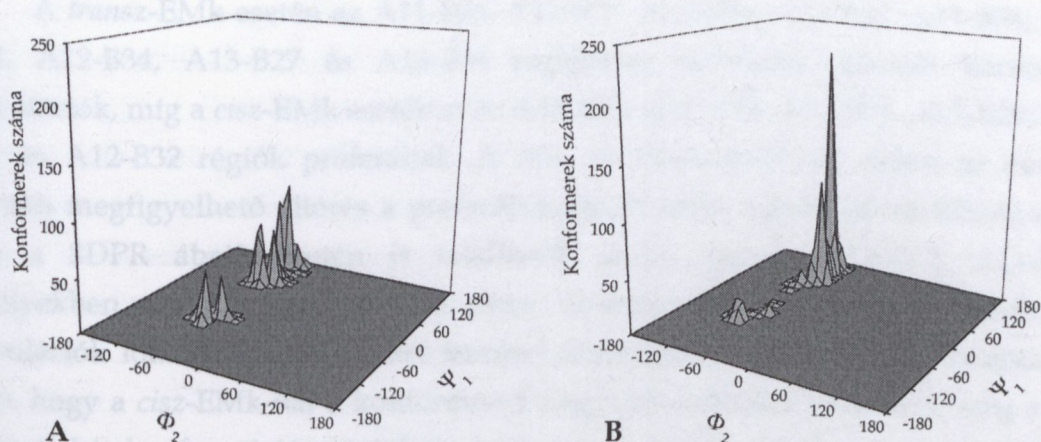
Preferált konformációs régiók			
<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N-EM1	A11-B26 (100) A11-B27 (69)	A12-B14 (55) A12-B15 (75)	A13-B14 (59)
<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N-EM1	A11-B15 (73) A11-B35 (55)	A12-B14 (74)	
<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM1	A11-B26 (85) A11-B27 (65)		A13-B14 (64)
<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM1	A11-B14 (57) A11-B15 (81) A11-B35 (54) A11-B36 (60)	A12-B15 (57) A12-B35 (54) A12-B36 (75)	
<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N-EM2	A11-B26 (94) A11-B27 (57)	A12-B14 (58) A12-B15 (84)	A13-B14 (68)
<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N-EM2	A11-B15 (78) A11-B32 (50) A11-B35 (58)	A12-B14 (61) A12-B15 (53)	
<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM2	A11-B26 (64) A11-B27 (74)	A12-B14 (68) A12-B15 (54)	
<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM2	A11-B15 (91) A11-B35 (58) A11-B36 (75)	A12-B14 (53) A12-B35 (57) A12-B36 (70)	

### 3.1.4. 3D pszeudo-Ramachandran ábrák

A háromdimenziós pszeudo-Ramachandran (3DPR) ábrák [73,74] elkészítésekor - a pszeudo-Ramachandran ábrákhoz hasonlóan - a Pro<sup>2</sup>  $\Phi_2$  torziós szögét, illetve a Tyr<sup>1</sup>  $\Psi_1$  torziós szögét használtuk fel (1. ábra) [III]. A  $\Phi_2$ - $\Psi_1$  konformációs felszínt - a 3DR ábrákhoz hasonlóan - ugyancsak  $36 \times 36$  régióra osztottuk fel, és a  $\Phi_2$ , valamint  $\Psi_1$  torziós szögekre vonatkozó  $10^\circ$ -os intervallumokat szintén A1-től A36-ig, illetve B1-től B36-ig jelöltük felölve a teljes  $-180^\circ$ -tól  $180^\circ$ -ig terjedő tartományt. A  $10^\circ \times 10^\circ$ -os konformációs régiókban meghatároztuk a konformer populációk nagyságát, majd ezeket ábráztuk a  $\Phi_2$  és  $\Psi_1$  torziós szögek függvényében.

A *cisz*- és *transz*-EMk  $\Phi_2$ - $\Psi_1$  3DPR ábráin (6. ábra) meghatároztuk a preferált  $\Phi_2$ - $\Psi_1$  régiókat (4. táblázat) [III].





6. ábra A *cisz*- és *transz*-H<sub>2</sub>N-EM2  $\Phi_2$ - $\Psi_1$  3DPR ábrái.

A: *transz*-H<sub>2</sub>N-EM2; B: *cisz*-H<sub>2</sub>N-EM2.

4. táblázat A *cisz*- és *transz*-EMk konformerei által preferált régiók a  $\Phi_2$ - $\Psi_1$  3DPR ábrákon. A zárójelben lévő számok a konformációs régiókban található konformer populációk nagyságát mutatják.

Preferált konformációs régiók			
<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N-EM1	A11-B32 (60) A11-B33 (74) A11-B34 (57)	A12-B33 (78)	A13-B27 (54)
<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N-EM1	A11-B32 (209) A11-B33 (137)	A12-B28 (103) A12-B29 (53)	
<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM1	A11-B32 (86) A11-B33 (103) A11-B34 (91)	A12-B33 (79)	A13-B34 (64)
<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM1	A11-B32 (159) A11-B33 (144)	A12-B28 (63) A12-B29 (118) A12-B32 (69)	
<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N-EM2	A11-B26 (51) A11-B27 (58) A11-B32 (71) A11-B33 (63) A11-B34 (53)	A12-B33 (87)	A13-B27 (54)
<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N-EM2	A11-B32 (224) A11-B33 (149)	A12-B28 (102)	
<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM2	A11-B32 (69) A11-B33 (105) A11-B34 (97)	A12-B33 (98) A12-B34 (56)	A13-B34 (69)
<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM2	A11-B32 (169) A11-B33 (182)	A12-B28 (89) A12-B29 (89) A12-B31 (51) A12-B32 (74)	

A *transz*-EMk esetén az A11-B26, A11-B27, A11-B32, A11-B33, A11-B34, A12-B33, A12-B34, A13-B27 és A13-B34 régiókban találhatók jelentős konformer populációk, míg a *cisz*-EMk esetében az A11-B32, A11-B33, A12-B28, A12-B29, A12-B31 és A12-B32 régiók preferáltak. A *cisz*- és *transz*-EMk-nál ebben az esetben szintén megfigyelhető eltérés a preferált konformációs régiók tekintetében, azonban a 3DPR ábrák esetén is találhatók olyan régiók (A11-B32, A11-B33), amelyekben mind a *cisz*, mind a *transz* izomer esetében nagyobb konformer populációk lokalizálódnak. A két izomert összehasonlítva azonban az tapasztalható, hogy a *cisz*-EMk-nál a konformerek nagyobb számban találhatók meg a fent említett két konformációs régióban, mint a *transz*-EMk-nál. Ennek megfelelően a 3DPR ábrákon a *cisz*-EMk esetén nagyobb és keskenyebb csúcsokat, míg a *transz*-EMk esetében kisebb és szélesebb csúcsokat figyelhetünk meg.

A  $\Phi_2$ - $\Psi_1$  3DPR ábrákon a *transz*-EMk esetén hasonló konformációs eloszlások figyelhetők meg, míg a *cisz*-EMk konformerei is nagyjából azonos eloszlásokat mutatnak. A *cisz* és *transz* izomereket összehasonlítva azonban a 3DPR ábrákon megfigyelhetők különbségek, egyrészt a konformációs régiók tekintetében, másrészt pedig az azonos  $\Phi_2$ - $\Psi_1$  régiókban található konformer populációk nagyságában.

### 3.1.5. Konformációs hasonlósági indexek

A 3DR és 3DPR ábrák alapján meghatározhatók a konformer populációk nagyságai a  $\Phi_i$ - $\Psi_i$  és  $\Phi_i$ - $\Psi_{i-1}$  felszínek  $10^\circ \times 10^\circ$ -os konformációs régióiban, és ennek segítségével egy aminosav párra kapott eloszlások összehasonlíthatóvá válnak. A konformációs felszínek ezen felosztása alapján azonban egy aminosav párra ( $X$  és  $X'$ ) vonatkozó  $\Phi_i$ - $\Psi_i$  vagy  $\Phi_i$ - $\Psi_{i-1}$  konformációs terek hasonlóságát jellemezhetjük egy ún. konformációs hasonlósági index (*conformational similarity index*,  $CS_{XX'}$ ) megadásával, amelyet az alábbi módon számíthatunk ki [75,76]:

$$CS_{XX'} = \frac{\sum_i (N_{Xi} - \langle N_X \rangle)(N_{X'i} - \langle N_{X'} \rangle)}{\sqrt{\sum_i (N_{Xi} - \langle N_X \rangle)^2 \sum_i (N_{X'i} - \langle N_{X'} \rangle)^2}}$$

$N_{Xi}$  a konformerek száma az  $i$   $10^\circ \times 10^\circ$ -os régióban az  $X$  aminosav esetén, míg  $N_{X'i}$  a konformerek száma az azonos  $i$  régióban az  $X'$  aminosav esetében.  $\langle N_X \rangle$  és  $\langle N_{X'} \rangle$  pedig a konformációs régiókban megfigyelhető átlagos konformerszámot jelenti az  $X$  és  $X'$  aminosavakra vonatkozóan. A  $CS_{XX'}$  index 0 és 1 között változik, és ez alapján meghatározható a hasonlóság egy aminosav pár konformációs eloszlásai között, ugyanis a 0 semmilyen, míg az 1 teljes hasonlóságot mutat a két aminosav eloszlására vonatkozóan.



A semleges vagy protonált N-terminálissal rendelkező, és *cisz* vagy *transz* Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> peptidkötést tartalmazó tetrapeptidek esetén összehasonlítottuk a Tyr<sup>1</sup>, Pro<sup>2</sup>, Trp<sup>3</sup>/Phe<sup>3</sup> és Phe<sup>4</sup> aminosavak konformációs eloszlásait a CS<sub>XX'</sub> indexek alapján. Mivel mind az EM1, mind az EM2 molekulát négyféleképpen modelleztük, így minden egyes aminosav esetén összesen nyolc konformációs eloszlást kaptunk. Ezeket az eloszlásokat összehasonlítva a CS<sub>XX'</sub> indexeket egy 8 × 8-as alsó triangu-láris mátrixban ábrázoltuk, amelyek esetén a főátlóban lévő CS<sub>XX'</sub> indexek értéke 1, hiszen ezekben az esetekben az adott peptid konformációs eloszlását önmagához hasonlítjuk.

A Pro<sup>2</sup>-ra vonatkozó mátrix (7. ábra) három részre osztható az alapján, hogy az endomorfink *cisz* vagy *transz*, illetve *cisz* és *transz* izomereit hasonlítjuk össze egymással. A *transz-transz* párok esetén a CS<sub>XX'</sub> 0,94 és 0,97 között változik, ami azt mutatja, hogy a *transz*-EMk konformációs eloszlásai szinte megegyeznek egymással. A *cisz-cisz* párok esetében a legkisebb CS<sub>XX'</sub> 0,79, míg a legnagyobb 0,98, tehát a *cisz*-EMk-nál tapasztalható eloszlások is nagy hasonlóságot mutatnak, és ezen párok közül két esetben (*cisz*-H<sub>2</sub>N-EM1 - *cisz*-H<sub>2</sub>N-EM2: 0,98; *cisz*-H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>-EM1 - *cisz*-H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>-EM2: 0,97) a CS<sub>XX'</sub> index szinte azonos konformációs eloszlásra utal. A *cisz-transz* párok esetén azonban a CS<sub>XX'</sub> 0,40 és 0,52 közötti értékeket mutat, ami azt jelenti, hogy a *cisz*- és *transz*-EMk-nál megfigyelhető eloszlások meglehetősen különböznek egymástól.

A Trp<sup>3</sup>/Phe<sup>3</sup>-ra vonatkozó mátrix (8. ábra) esetén a CS<sub>XX'</sub> 0,67 és 0,93 között változik, ami szintén a konformációs eloszlások hasonlóságára utal, és a *transz-transz* párok esetében a CS<sub>XX'</sub> index 0,90 és 0,93 közötti értékei az eloszlások nagyon jó egyezését mutatják.

A Phe<sup>4</sup>-ra vonatkozó mátrixban (9. ábra) található CS<sub>XX'</sub> indexek 0,90 fölötti értékei arról tanúskodnak, hogy ezen aminosavra vonatkozó konformációs eloszlások nagyfokú egyezést mutatnak mind a nyolc molekula esetében.

A Pro<sup>2</sup> és Tyr<sup>1</sup> aminosavakra vonatkozó mátrix (10. ábra) szintén három részre bontható az alapján, hogy az EM1 és EM2 tetrapeptidek *cisz* vagy *transz*, illetve *cisz* és *transz* izomereit hasonlítjuk össze egymással. A *transz-transz* párok esetén a legkisebb CS<sub>XX'</sub> 0,82, míg a legnagyobb 0,98, vagyis a *transz*-EMk-nál megfigyelhető konformációs eloszlások nagy hasonlóságot mutatnak, és két esetben (*transz*-H<sub>2</sub>N-EM1 - *transz*-H<sub>2</sub>N-EM2: 0,96; *transz*-H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>-EM1 - *transz*-H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>-EM2: 0,98) a CS<sub>XX'</sub> index magas értéke azonos eloszlásra enged következtetni. A *cisz-cisz* párok esetében a CS<sub>XX'</sub> 0,91 és 0,99 között változik, ami azt mutatja, hogy a *cisz*-EMk konformációs eloszlásai szinte megegyeznek egymással. A *cisz-transz* párok esetén azonban a CS<sub>XX'</sub> 0,54 és 0,69 közötti értékeket mutat, ami arra utal, hogy a *cisz*- és *transz*-EMk-nál tapasztalható eloszlások nagyobb mértékben különböznek egymástól.



<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N-EM1	1							
<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM1	0,96	1						
<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N-EM2	0,97	0,95	1					
<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM2	0,94	0,95	0,94	1				
<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N-EM1	0,43	0,43	0,45	0,52	1			
<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM1	0,42	0,43	0,42	0,49	0,79	1		
<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N-EM2	0,43	0,43	0,44	0,50	0,98	0,83	1	
<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM2	0,41	0,42	0,40	0,49	0,82	0,97	0,86	1
	<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N-EM1	<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM1	<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N-EM2	<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM2	<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N-EM1	<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM1	<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N-EM2	<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM2

7. ábra A Pro<sup>2</sup>-ra vonatkozó CS<sub>XX'</sub> indexek mátrixa.

<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N-EM1	1							
<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM1	0,91	1						
<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N-EM2	0,91	0,91	1					
<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM2	0,91	0,90	0,93	1				
<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N-EM1	0,81	0,85	0,75	0,79	1			
<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM1	0,75	0,74	0,67	0,70	0,77	1		
<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N-EM2	0,81	0,83	0,79	0,82	0,88	0,71	1	
<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM2	0,76	0,76	0,71	0,71	0,82	0,85	0,81	1
	<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N-EM1	<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM1	<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N-EM2	<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM2	<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N-EM1	<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM1	<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N-EM2	<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM2

8. ábra A Trp<sup>3</sup>/Phe<sup>3</sup>-ra vonatkozó CS<sub>XX'</sub> indexek mátrixa.

<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N-EM1	1							
<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM1	0,95	1						
<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N-EM2	0,94	0,95	1					
<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM2	0,94	0,96	0,96	1				
<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N-EM1	0,94	0,95	0,95	0,94	1			
<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM1	0,92	0,94	0,93	0,91	0,93	1		
<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N-EM2	0,94	0,95	0,96	0,95	0,95	0,91	1	
<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM2	0,90	0,94	0,93	0,94	0,92	0,94	0,92	1
	<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N-EM1	<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM1	<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N-EM2	<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM2	<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N-EM1	<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM1	<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N-EM2	<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM2

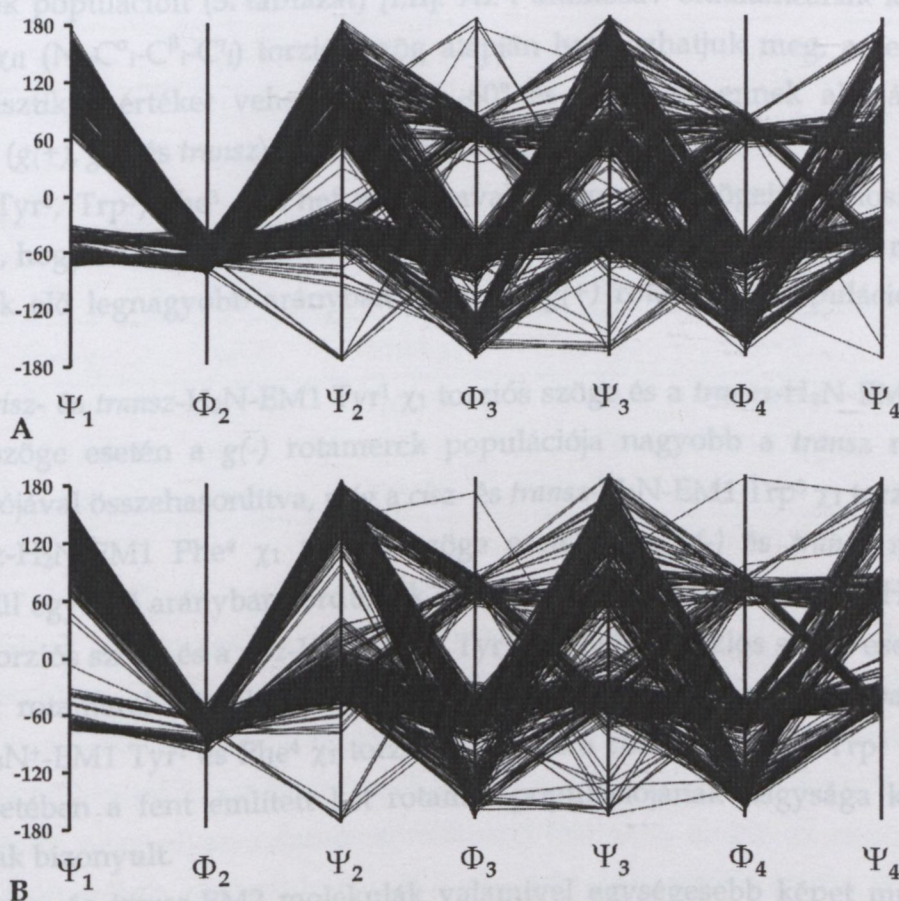
9. ábra A Phe<sup>4</sup>-ra vonatkozó CS<sub>XX'</sub> indexek mátrixa.

<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N-EM1	1							
<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM1	0,88	1						
<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N-EM2	0,96	0,82	1					
<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM2	0,87	0,98	0,82	1				
<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N-EM1	0,59	0,68	0,56	0,60	1			
<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM1	0,59	0,69	0,55	0,62	0,92	1		
<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N-EM2	0,58	0,67	0,55	0,59	0,99	0,91	1	
<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM2	0,58	0,68	0,54	0,61	0,95	0,97	0,95	1
	<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N-EM1	<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM1	<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N-EM2	<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM2	<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N-EM1	<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM1	<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N-EM2	<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM2

10. ábra A Pro<sup>2</sup>-ra és Tyr<sup>1</sup>-ra vonatkozó CS<sub>XX'</sub> indexek mátrixa.

### 3.1.6. Parallel-koordinátás ábrák

A Ramachandran és 3DR ábrák a konformerek eloszlását egy aminosavra ( $i$ ) vonatkozó  $\Phi_i$  és  $\Psi_i$  torziós szögek függvényében mutatják be. A pszeudo-Ramachandran és 3DPR ábrák pedig két szomszédos aminosav ( $i$  és  $i-1$ )  $\Phi_i$  és  $\Psi_{i-1}$  torziós szögei alapján szemléltetik a konformációs eloszlásokat. Ezzel ellentétben a parallel-koordinátás ábrázolásmód használatával a peptidet alkotó összes aminosav  $\Phi$  és  $\Psi$  torziós szögeit ábrázolhatjuk egyidőben [77,78], és így felhasználhatjuk a peptidek különböző struktúrával rendelkező konformereinek bemutatására, illetve összehasonlítására. A konformerek ezen grafikai ábrázolásában a tengelyek egymással párhuzamosak, és megfelelnek a szekvenciában egymást követő aminosavak  $\Phi$  és  $\Psi$  torziós szögeinek. Így ezeken a parallel-koordinátás ábrákon a konformerek vonalakkal vannak reprezentálva, amelyek az adott konformer aminosavaira jellemző  $\Phi$  és  $\Psi$  torziós szög értékeket kötik össze az egymást követő tengelyeken.



11. ábra A *cis*- és *trans*-H<sub>2</sub>N-EM2 parallel-koordinátás ábrái.

A: *trans*-H<sub>2</sub>N-EM2; B: *cis*-H<sub>2</sub>N-EM2.



Az endomorfinok parallel-koordinátás ábrái (11. ábra) utalnak ezen tetrapeptidek nagyfokú flexibilitására. Ennek ellenére azonban az ábrákon látható, hogy a Tyr<sup>1</sup>  $\Psi_1$  torziós szöge két tartományban (egy pozitív és egy negatív intervallum) vehet fel értékeket, és a Pro<sup>2</sup>  $\Phi_2$  torziós szöge egy szűk tartománnyal jellemezhető, összefüggésben azzal, hogy ez a torziós szög a Pro<sup>2</sup> pirrolidin gyűrűjében található, és ebben az esetben gátolt a szabad rotáció. A  $\Phi_2$ - $\Psi_2$  Ramachandran és 3DR ábrákhoz hasonlóan, a Pro<sup>2</sup>  $\Psi_2$  torziós szöge esetén szintén megfigyelhető a különbség a *cisz*- és *transz*-EMk konformereire vonatkozóan, ugyanis a *cisz*-EMk esetében található egy olyan szögtartomány ( $40^\circ < \Psi_2 < 80^\circ$ ), amelyben teljesen hiányoznak a konformerek. A Trp<sup>3</sup>/Phe<sup>3</sup> és Phe<sup>4</sup> aminosavak  $\Phi$  és  $\Psi$  torziós szögei többféle értéket vehetnek fel, utalva ezzel is a tetrapeptidek flexibilitására.

### 3.2. Oldallánc rotamerek

A *cisz*- és *transz*-EMk esetén megvizsgáltuk a Tyr<sup>1</sup>, Trp<sup>3</sup>/Phe<sup>3</sup> és Phe<sup>4</sup> aminosavak oldalláncainak konformációs állapotát, és meghatároztuk a *g*(+), *g*(-) és *transz* rotamerek populációit (5. táblázat) [I,II]. Az *i* aminosav oldalláncának konformációját a  $\chi_{i1}$  ( $N_i-C^\alpha_i-C^\beta_i-C^\gamma_i$ ) torziós szög alapján határozhatjuk meg, amely három karakterisztikus értéket vehet fel ( $60^\circ$ ,  $-60^\circ$  és  $180^\circ$ ), és ennek alapján három rotamert (*g*(+), *g*(-) és *transz*) különböztethetünk meg.

A Tyr<sup>1</sup>, Trp<sup>3</sup>/Phe<sup>3</sup> és Phe<sup>4</sup> aminosavak  $\chi_1$  torziós szögeinek eloszlásai azt mutatják, hogy az endomorfinok mindkét izomere esetén a *g*(-) és *transz* rotamerek fordulnak elő legnagyobb arányban, illetve a *g*(+) rotamerek populációja a legkisebb.

A *cisz*- és *transz*-H<sub>2</sub>N-EM1 Tyr<sup>1</sup>  $\chi_1$  torziós szöge és a *transz*-H<sub>2</sub>N-EM1 Phe<sup>4</sup>  $\chi_1$  torziós szöge esetén a *g*(-) rotamerek populációja nagyobb a *transz* rotamerek populációjával összehasonlítva, míg a *cisz*- és *transz*-H<sub>2</sub>N-EM1 Trp<sup>3</sup>  $\chi_1$  torziós szöge és a *cisz*-H<sub>2</sub>N-EM1 Phe<sup>4</sup>  $\chi_1$  torziós szöge esetében a *g*(-) és *transz* rotamerek körülbelül egyenlő arányban fordulnak elő a konformerekben. A *transz*-H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>-EM1 Trp<sup>3</sup>  $\chi_1$  torziós szöge és a *cisz*-H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>-EM1 Tyr<sup>1</sup> és Phe<sup>4</sup>  $\chi_1$  torziós szöge esetén a *g*(-) és *transz* rotamerek közül az előbbiek jelennek meg nagyobb arányban, míg a *transz*-H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>-EM1 Tyr<sup>1</sup> és Phe<sup>4</sup>  $\chi_1$  torziós szöge és a *cisz*-H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>-EM1 Trp<sup>3</sup>  $\chi_1$  torziós szöge esetében a fent említett két rotamer populációjának nagysága körülbelül azonosnak bizonyult.

A *cisz*- és *transz*-EM2 molekulák valamivel egységesebb képet mutatnak a rotamer populációk tekintetében, ugyanis a Tyr<sup>1</sup> és Phe<sup>4</sup>  $\chi_1$  torziós szöge esetén a két leggyakoribb konformációs állapot (*g*(-) és *transz*) közül a *g*(-) rotamerek populációja a nagyobb, míg ezen tetrapeptidek Phe<sup>3</sup>  $\chi_1$  torziós szöge esetében a két preferált rotamer populációja körülbelül ugyanakkora.

5. táblázat A *cisz*- és *transz*-EMk Tyr<sup>1</sup>, Trp<sup>3</sup>/Phe<sup>3</sup> és Phe<sup>4</sup> aminosav-oldalláncainak rotamer populációi.

	<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N- EM1	<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N- EM1	<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N- EM1	<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N- EM1	<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N- EM1	<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N- EM1
	Tyr <sup>1</sup> -χ <sub>1</sub>	Tyr <sup>1</sup> -χ <sub>1</sub>	Trp <sup>3</sup> -χ <sub>1</sub>	Trp <sup>3</sup> -χ <sub>1</sub>	Phe <sup>4</sup> -χ <sub>1</sub>	Phe <sup>4</sup> -χ <sub>1</sub>
<i>g</i> (+)	18,6%	19,7%	22,9%	22,5%	19,7%	20,6%
<i>g</i> (-)	42,9%	44,7%	39,5%	39,0%	43,6%	40,8%
<i>transz</i>	38,5%	35,6%	37,6%	38,5%	36,7%	38,6%
	<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> - EM1	<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> - EM1	<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> - EM1	<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> - EM1	<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> - EM1	<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> - EM1
	Tyr <sup>1</sup> -χ <sub>1</sub>	Tyr <sup>1</sup> -χ <sub>1</sub>	Trp <sup>3</sup> -χ <sub>1</sub>	Trp <sup>3</sup> -χ <sub>1</sub>	Phe <sup>4</sup> -χ <sub>1</sub>	Phe <sup>4</sup> -χ <sub>1</sub>
<i>g</i> (+)	22,7%	24,3%	22,6%	21,9%	24,2%	22,4%
<i>g</i> (-)	39,6%	40,7%	42,2%	37,8%	39,4%	42,0%
<i>transz</i>	37,7%	35,0%	35,2%	40,3%	36,4%	35,6%
	<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N- EM2	<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N- EM2	<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N- EM2	<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N- EM2	<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N- EM2	<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N- EM2
	Tyr <sup>1</sup> -χ <sub>1</sub>	Tyr <sup>1</sup> -χ <sub>1</sub>	Phe <sup>3</sup> -χ <sub>1</sub>	Phe <sup>3</sup> -χ <sub>1</sub>	Phe <sup>4</sup> -χ <sub>1</sub>	Phe <sup>4</sup> -χ <sub>1</sub>
<i>g</i> (+)	18,2%	19,0%	22,2%	23,0%	20,3%	22,7%
<i>g</i> (-)	43,2%	43,6%	39,6%	38,5%	42,2%	43,4%
<i>transz</i>	38,6%	37,4%	38,2%	38,5%	37,5%	33,9%
	<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> - EM2	<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> - EM2	<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> - EM2	<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> - EM2	<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> - EM2	<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> - EM2
	Tyr <sup>1</sup> -χ <sub>1</sub>	Tyr <sup>1</sup> -χ <sub>1</sub>	Phe <sup>3</sup> -χ <sub>1</sub>	Phe <sup>3</sup> -χ <sub>1</sub>	Phe <sup>4</sup> -χ <sub>1</sub>	Phe <sup>4</sup> -χ <sub>1</sub>
<i>g</i> (+)	21,8%	23,7%	24,1%	20,7%	20,2%	20,9%
<i>g</i> (-)	42,5%	39,8%	38,8%	39,4%	41,8%	41,5%
<i>transz</i>	35,7%	36,5%	37,1%	39,9%	38,0%	37,6%

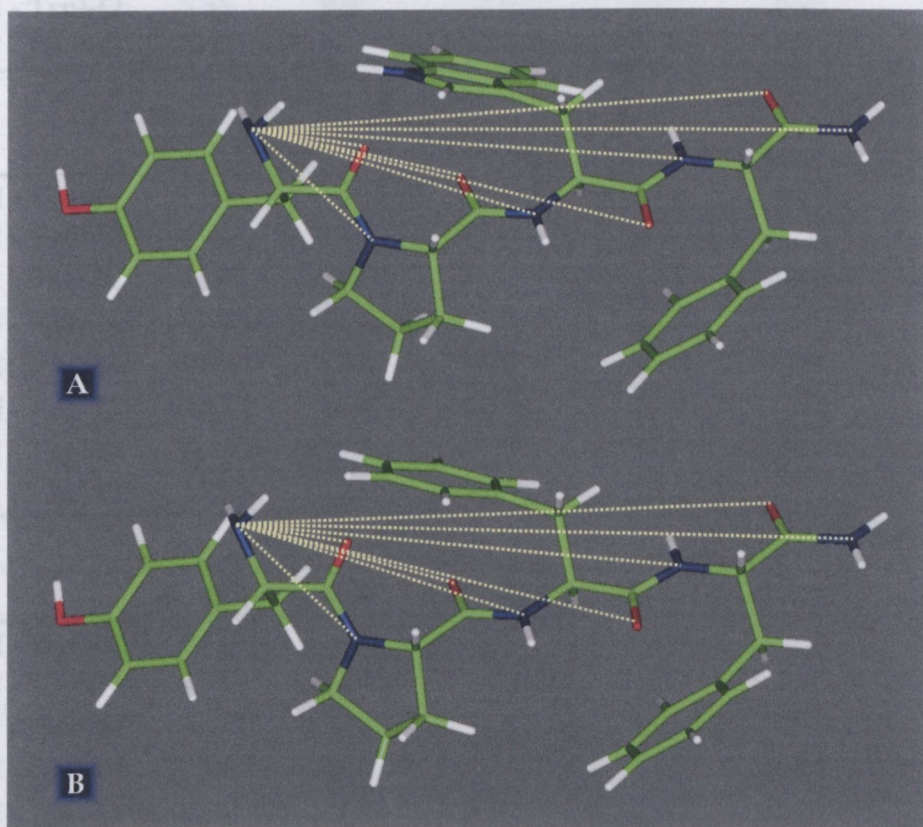
Az endomorfínok esetén megvizsgáltuk azt is, hogy az aromás aminosavak oldalláncainak rotamerei milyen kombinációkban fordulnak elő a különböző konformerekben [III]. Mivel a Tyr<sup>1</sup>, Trp<sup>3</sup>/Phe<sup>3</sup> és Phe<sup>4</sup> aminosavak esetében a *g*(-) és *transz* rotamerek fordulnak elő legnagyobb arányban, így nem meglepő, hogy a rotamer kombinációkban is főként ezek a konformációs állapotok figyelhetők meg. Mindenesetre négy olyan rotamer kombináció található, amely az endomorfínok mindkét izomerében előfordul: *g*(-), *g*(-), *g*(-); *g*(-), *g*(-), *transz*; *transz*, *g*(-), *g*(-) és *transz*, *transz*, *g*(-).



### 3.3. Intramolekuláris távolságok

#### 3.3.1. Molekulagerinc atomok közötti távolságok

Az endomorfinek N-terminális N atomjához képest megmértük a molekulagerinc N és O atomjainak távolságait (12. ábra) [I,II]: Tyr<sup>1</sup>-N - Pro<sup>2</sup>-N, Tyr<sup>1</sup>-N - Trp<sup>3</sup>-N, Tyr<sup>1</sup>-N - Phe<sup>3</sup>-N, Tyr<sup>1</sup>-N - Phe<sup>4</sup>-N, Tyr<sup>1</sup>-N - NH<sub>2</sub>-N, Tyr<sup>1</sup>-N - Tyr<sup>1</sup>-O, Tyr<sup>1</sup>-N - Pro<sup>2</sup>-O, Tyr<sup>1</sup>-N - Trp<sup>3</sup>-O, Tyr<sup>1</sup>-N - Phe<sup>3</sup>-O és Tyr<sup>1</sup>-N - Phe<sup>4</sup>-O. Minden atompár esetén meghatároztuk a minimum és maximum távolságokat, valamint a távolság intervallumok nagyságát (6. táblázat) [I,II].



12. ábra A molekulagerinc N és O atomjainak távolsága az N-terminális N atomhoz képest. A: EM1; B: EM2.

A *cisz*- és *transz*-EMk esetén különbség mutatkozik az egymástól szekvenciálisan távolabb található atomok minimum és maximum távolságaiban, valamint a távolság tartományok nagyságában. A *cisz*-EMk-nál a minimum és maximum távolságok, illetve a távolság tartományok is kisebbek, mint a *transz*-EMk esetében. Ezek a különbségek a Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> peptidkötés *cisz* és *transz* állapotával magyarázhatók, ugyanis a *cisz* peptidkötés alapvetően egy hajlottabb struktúrát eredményez a *transz* izomerhez képest, ami a molekulagerinc atomok közötti távolságok csökkenéséhez vezet.

6. táblázat A *cisz*- és *transz*-EMk molekulagerinc atomjai közötti minimum ( $d_{\min}$ ) és maximum ( $d_{\max}$ ) távolságok, illetve távolság tartományok ( $d_{\max}-d_{\min}$ ).

	<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N-EM1			<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N-EM1		
	$d_{\min}/\text{\AA}$	$d_{\max}/\text{\AA}$	$d_{\max}-d_{\min}/\text{\AA}$	$d_{\min}/\text{\AA}$	$d_{\max}/\text{\AA}$	$d_{\max}-d_{\min}/\text{\AA}$
Tyr <sup>1</sup> -N - Pro <sup>2</sup> -N	2,94	3,71	0,77	2,98	3,73	0,75
Tyr <sup>1</sup> -N - Trp <sup>3</sup> -N	4,09	6,89	2,80	2,95	5,70	2,75
Tyr <sup>1</sup> -N - Phe <sup>4</sup> -N	3,75	10,28	6,53	3,10	8,50	5,40
Tyr <sup>1</sup> -N - NH <sub>2</sub> -N	3,27	13,71	10,44	3,10	11,95	8,85
Tyr <sup>1</sup> -N - Tyr <sup>1</sup> -O	2,66	3,58	0,92	2,65	3,65	1,00
Tyr <sup>1</sup> -N - Pro <sup>2</sup> -O	4,17	6,87	2,70	2,88	5,95	3,07
Tyr <sup>1</sup> -N - Trp <sup>3</sup> -O	3,51	9,87	6,36	2,91	8,53	5,62
Tyr <sup>1</sup> -N - Phe <sup>4</sup> -O	3,02	13,35	10,33	2,95	11,37	8,42
	<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM1			<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM1		
	$d_{\min}/\text{\AA}$	$d_{\max}/\text{\AA}$	$d_{\max}-d_{\min}/\text{\AA}$	$d_{\min}/\text{\AA}$	$d_{\max}/\text{\AA}$	$d_{\max}-d_{\min}/\text{\AA}$
Tyr <sup>1</sup> -N - Pro <sup>2</sup> -N	2,97	3,73	0,76	3,01	3,73	0,72
Tyr <sup>1</sup> -N - Trp <sup>3</sup> -N	4,12	6,88	2,76	3,19	5,55	2,36
Tyr <sup>1</sup> -N - Phe <sup>4</sup> -N	4,19	10,48	6,29	3,32	8,54	5,22
Tyr <sup>1</sup> -N - NH <sub>2</sub> -N	3,56	13,35	9,79	3,18	12,08	8,90
Tyr <sup>1</sup> -N - Tyr <sup>1</sup> -O	2,64	3,61	0,97	2,66	3,67	1,01
Tyr <sup>1</sup> -N - Pro <sup>2</sup> -O	4,15	6,94	2,79	2,80	6,01	3,21
Tyr <sup>1</sup> -N - Trp <sup>3</sup> -O	2,98	10,15	7,17	2,75	8,41	5,66
Tyr <sup>1</sup> -N - Phe <sup>4</sup> -O	2,85	13,48	10,63	2,79	11,70	8,91
	<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N-EM2			<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N-EM2		
	$d_{\min}/\text{\AA}$	$d_{\max}/\text{\AA}$	$d_{\max}-d_{\min}/\text{\AA}$	$d_{\min}/\text{\AA}$	$d_{\max}/\text{\AA}$	$d_{\max}-d_{\min}/\text{\AA}$
Tyr <sup>1</sup> -N - Pro <sup>2</sup> -N	2,94	3,71	0,77	2,98	3,69	0,71
Tyr <sup>1</sup> -N - Trp <sup>3</sup> -N	4,11	6,85	2,74	2,95	5,66	2,71
Tyr <sup>1</sup> -N - Phe <sup>4</sup> -N	3,87	10,19	6,32	3,11	8,53	5,42
Tyr <sup>1</sup> -N - NH <sub>2</sub> -N	3,27	12,86	9,59	3,10	11,96	8,86
Tyr <sup>1</sup> -N - Tyr <sup>1</sup> -O	2,65	3,57	0,92	2,67	3,64	0,97
Tyr <sup>1</sup> -N - Pro <sup>2</sup> -O	4,18	6,89	2,71	2,90	6,16	3,26
Tyr <sup>1</sup> -N - Trp <sup>3</sup> -O	3,75	9,93	6,18	2,86	8,37	5,51
Tyr <sup>1</sup> -N - Phe <sup>4</sup> -O	2,97	12,83	9,86	2,93	11,76	8,83
	<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM2			<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM2		
	$d_{\min}/\text{\AA}$	$d_{\max}/\text{\AA}$	$d_{\max}-d_{\min}/\text{\AA}$	$d_{\min}/\text{\AA}$	$d_{\max}/\text{\AA}$	$d_{\max}-d_{\min}/\text{\AA}$
Tyr <sup>1</sup> -N - Pro <sup>2</sup> -N	2,97	3,73	0,76	3,01	3,70	0,69
Tyr <sup>1</sup> -N - Trp <sup>3</sup> -N	4,08	6,94	2,86	3,09	5,47	2,38
Tyr <sup>1</sup> -N - Phe <sup>4</sup> -N	4,00	10,30	6,30	3,09	8,56	5,47
Tyr <sup>1</sup> -N - NH <sub>2</sub> -N	3,58	13,53	9,95	3,25	12,01	8,76
Tyr <sup>1</sup> -N - Tyr <sup>1</sup> -O	2,64	3,60	0,96	2,69	3,68	0,99
Tyr <sup>1</sup> -N - Pro <sup>2</sup> -O	4,16	6,90	2,74	2,78	6,10	3,32
Tyr <sup>1</sup> -N - Trp <sup>3</sup> -O	3,04	10,04	7,00	2,78	8,53	5,75
Tyr <sup>1</sup> -N - Phe <sup>4</sup> -O	2,85	13,34	10,49	2,78	11,74	8,96



A Tyr<sup>1</sup>-N - Phe<sup>4</sup>-N, Tyr<sup>1</sup>-N - NH<sub>2</sub>-N, Tyr<sup>1</sup>-N - Trp<sup>3</sup>-O, Tyr<sup>1</sup>-N - Phe<sup>3</sup>-O és Tyr<sup>1</sup>-N - Phe<sup>4</sup>-O atompárok közötti távolságok meglehetősen nagy intervallumban változnak, ami érthető is, hiszen az endomorfinok nagy flexibilitással rendelkező tetrapeptidek. Mindenesetre a kisebb távolságok azt mutatják, hogy a molekulagerinc atomjai között kialakulhatnak intramolekuláris H-kötések, amelyek stabilizálhatják a szerkezeteket, és így lehetőség nyíltat különféle turn struktúrák kialakulására. Ugyanakkor a nagyobb távolságok a nyújtott molekulagerinccel rendelkező konformereket jellemzik.

### 3.3.2. Pszeudoatomok közötti távolságok

Az endomorfinok Tyr<sup>1</sup>, Trp<sup>3</sup>/Phe<sup>3</sup> és Phe<sup>4</sup> aminosavai esetén az aromás oldalláncok gyűrűinek, valamint a Pro<sup>2</sup> pirrolidin gyűrűjének geometriai középontjába pszeudoatomokat definiáltunk, és megmértük ezek egymáshoz viszonyított távolságait (13. ábra) [I,II]: Tyr<sup>1</sup>-Trp(5)<sup>3</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Trp(6)<sup>3</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>3</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>4</sup>, Trp(5)<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup>, Trp(6)<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup>, Phe<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup>, Pro<sup>2</sup>-Tyr<sup>1</sup>, Pro<sup>2</sup>-Trp(5)<sup>3</sup>, Pro<sup>2</sup>-Trp(6)<sup>3</sup>, Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup> és Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>4</sup> (a Trp(5) a triptofán indol oldalláncának öttagú gyűrűjét, míg a Trp(6) az oldallánc hattagú gyűrűjét jelöli). Minden pszeudoatom pár esetén meghatároztuk a minimum és maximum távolságokat, illetve a távolság tartományok nagyságát (7. táblázat) [I,II].

A pszeudoatomok közötti távolságok szintén nagy intervallumban változnak. A *cis*- és *transz*-EMk esetén különbség figyelhető meg a Tyr<sup>1</sup>-Trp(5)<sup>3</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Trp(6)<sup>3</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>3</sup> és Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>4</sup> távolságok tekintetében. A *cis*-EMk-nál a maximum távolságok és a távolság tartományok kisebbek, mint a *transz*-EMk esetében, ugyanakkor a minimum távolságokban nem mutatkozik lényeges különbség a két izomer között. Ezek a különbségek szintén a Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> peptidkötés *cis* és *transz* állapotával magyarázhatók. Ugyanakkor a többi pszeudoatom közötti távolság esetén nem észlelhető számottevő különbség a két izomer tekintetében.

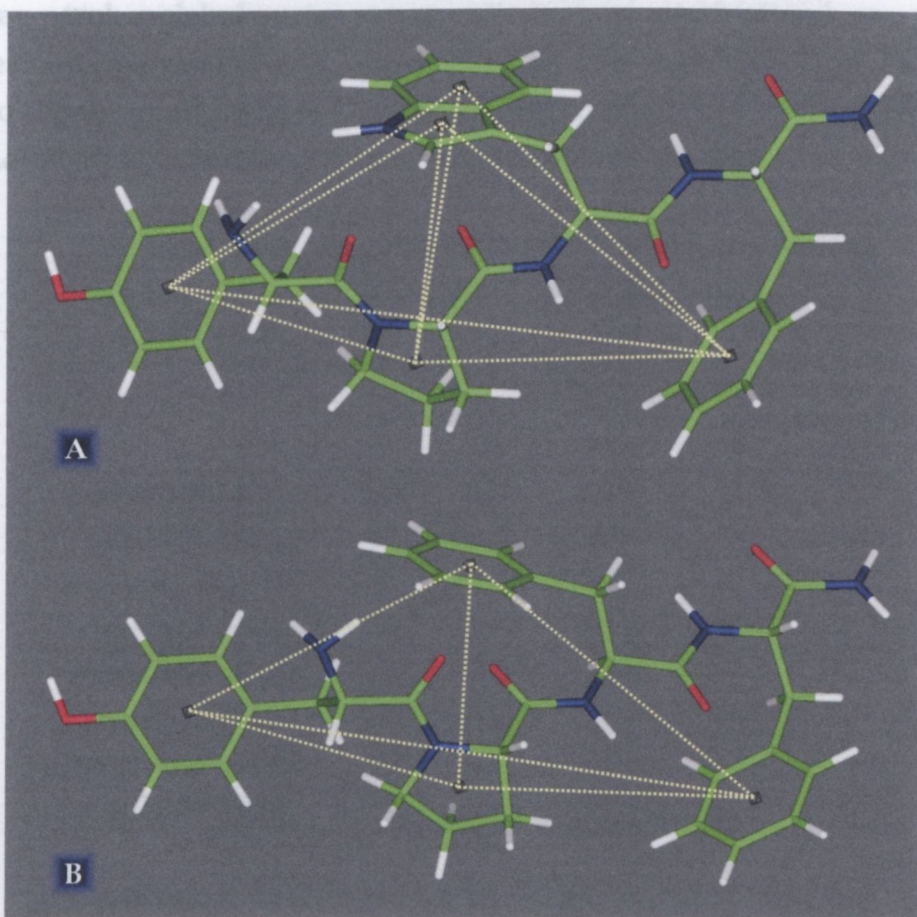
Az aromás gyűrűk között megfigyelhető kisebb pszeudoatom távolságok arra utalnak, hogy bizonyos esetekben a Tyr<sup>1</sup>, Trp<sup>3</sup>/Phe<sup>3</sup> és Phe<sup>4</sup> aminosavak aromás oldalláncai közel kerülhetnek egymáshoz, ezáltal lehetőség nyíltat különböző aromás-aromás kölcsönhatások kialakulására.

A Pro<sup>2</sup> pirrolidin gyűrűje és az aromás aminosavak gyűrűi között található kisebb pszeudoatom távolságok pedig arra engednek következtetni, hogy előfordulhatnak olyan esetek is, amikor a Pro<sup>2</sup> gyűrűje, valamint a Tyr<sup>1</sup>, Trp<sup>3</sup>/Phe<sup>3</sup> és Phe<sup>4</sup> aminosavak aromás gyűrűi kerülnek közel egymáshoz, és így kialakulhatnak különböző prolin-aromás kölcsönhatások.

7. táblázat A *cisz*- és *transz*-EMk pszeudoatomjai közötti minimum ( $d_{\min}$ ) és maximum ( $d_{\max}$ ) távolságok, illetve távolság tartományok ( $d_{\max}-d_{\min}$ ).

	<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N-EM1			<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N-EM1		
	$d_{\min}/\text{\AA}$	$d_{\max}/\text{\AA}$	$d_{\max}-d_{\min}/\text{\AA}$	$d_{\min}/\text{\AA}$	$d_{\max}/\text{\AA}$	$d_{\max}-d_{\min}/\text{\AA}$
Pro <sup>2</sup> -Tyr <sup>1</sup>	4,15	7,42	3,27	4,04	7,42	3,38
Pro <sup>2</sup> -Trp(5) <sup>3</sup>	4,31	8,64	4,33	4,35	8,63	4,28
Pro <sup>2</sup> -Trp(6) <sup>3</sup>	4,36	10,06	5,70	4,39	10,05	5,66
Pro <sup>2</sup> -Phe <sup>4</sup>	4,33	12,19	7,86	4,35	12,10	7,75
Tyr <sup>1</sup> -Trp(5) <sup>3</sup>	3,44	14,06	10,62	3,61	12,57	8,96
Tyr <sup>1</sup> -Trp(6) <sup>3</sup>	3,40	15,44	12,04	3,45	13,94	10,49
Tyr <sup>1</sup> -Phe <sup>4</sup>	3,57	17,85	14,28	3,49	16,16	12,67
Trp(5) <sup>3</sup> -Phe <sup>4</sup>	3,59	11,23	7,64	3,54	11,22	7,68
Trp(6) <sup>3</sup> -Phe <sup>4</sup>	3,55	12,52	8,97	3,55	12,43	8,88
	<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM1			<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM1		
	$d_{\min}/\text{\AA}$	$d_{\max}/\text{\AA}$	$d_{\max}-d_{\min}/\text{\AA}$	$d_{\min}/\text{\AA}$	$d_{\max}/\text{\AA}$	$d_{\max}-d_{\min}/\text{\AA}$
Pro <sup>2</sup> -Tyr <sup>1</sup>	4,15	7,36	3,21	4,02	7,36	3,34
Pro <sup>2</sup> -Trp(5) <sup>3</sup>	4,22	8,59	4,37	4,32	8,63	4,31
Pro <sup>2</sup> -Trp(6) <sup>3</sup>	4,32	9,91	5,59	4,32	9,83	5,51
Pro <sup>2</sup> -Phe <sup>4</sup>	4,22	12,19	7,97	4,25	12,17	7,92
Tyr <sup>1</sup> -Trp(5) <sup>3</sup>	3,40	14,24	10,84	3,49	12,49	9,00
Tyr <sup>1</sup> -Trp(6) <sup>3</sup>	3,51	15,75	12,24	3,44	13,88	10,44
Tyr <sup>1</sup> -Phe <sup>4</sup>	3,58	17,92	14,34	3,53	16,41	12,88
Trp(5) <sup>3</sup> -Phe <sup>4</sup>	3,58	11,25	7,67	3,59	11,23	7,64
Trp(6) <sup>3</sup> -Phe <sup>4</sup>	3,57	12,85	9,28	3,52	12,63	9,11
	<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N-EM2			<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N-EM2		
	$d_{\min}/\text{\AA}$	$d_{\max}/\text{\AA}$	$d_{\max}-d_{\min}/\text{\AA}$	$d_{\min}/\text{\AA}$	$d_{\max}/\text{\AA}$	$d_{\max}-d_{\min}/\text{\AA}$
Pro <sup>2</sup> -Tyr <sup>1</sup>	4,16	7,36	3,20	4,03	7,42	3,39
Pro <sup>2</sup> -Phe <sup>3</sup>	4,31	8,78	4,47	4,51	8,80	4,29
Pro <sup>2</sup> -Phe <sup>4</sup>	4,33	12,28	7,95	4,26	12,13	7,87
Tyr <sup>1</sup> -Phe <sup>3</sup>	3,60	14,17	10,57	3,55	12,64	9,09
Tyr <sup>1</sup> -Phe <sup>4</sup>	3,54	17,86	13,55	3,59	16,09	12,50
Phe <sup>3</sup> -Phe <sup>4</sup>	3,78	11,44	7,66	3,62	11,48	7,86
	<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM2			<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM2		
	$d_{\min}/\text{\AA}$	$d_{\max}/\text{\AA}$	$d_{\max}-d_{\min}/\text{\AA}$	$d_{\min}/\text{\AA}$	$d_{\max}/\text{\AA}$	$d_{\max}-d_{\min}/\text{\AA}$
Pro <sup>2</sup> -Tyr <sup>1</sup>	4,17	7,34	3,17	4,02	7,41	3,39
Pro <sup>2</sup> -Phe <sup>3</sup>	4,31	8,79	4,48	4,37	8,78	4,41
Pro <sup>2</sup> -Phe <sup>4</sup>	4,25	12,25	8,00	4,24	12,15	7,91
Tyr <sup>1</sup> -Phe <sup>3</sup>	3,83	14,23	10,40	3,50	12,60	9,10
Tyr <sup>1</sup> -Phe <sup>4</sup>	3,55	17,91	14,36	3,57	16,41	12,84
Phe <sup>3</sup> -Phe <sup>4</sup>	3,70	11,44	7,74	3,63	11,47	7,84





13. ábra A Tyr<sup>1</sup>, Trp<sup>3</sup>/Phe<sup>3</sup> és Phe<sup>4</sup> aminosavak aromás gyűrűinek, valamint a Pro<sup>2</sup> pirrolidin gyűrűjének geometriai középpontjába definiált pszeudoatomok közötti távolságok. A: EM1; B: EM2.

### 3.4. Intramolekuláris H-kötések

Az endomorfinkban kialakulhatnak intramolekuláris H-kötések a molekula-gerinc atomjai között, amelyek stabilizálhatják a különböző konformereket. Az EM1 és EM2 mindkét izomere esetén megvizsgáltuk ezen H-kötések előfordulását és gyakoriságát [I,II]. Az intramolekuláris H-kötések azonosításához két geometriai kritériumot alkalmaztunk, melyek szerint az NH donor csoport és a CO akceptor csoport között akkor van H-kötés, ha a N és O atomok közötti távolság kisebb, mint 3,5 Å, továbbá ha az NH kötés, valamint a H és O atomot összekötő egyenes által bezárt szög (N-H···O szög) nagyobb, mint 120°.

Az endomorfink konformerei között találhatók olyanok, amelyekben egyáltalán nem alakul ki intramolekuláris H-kötés, és vannak egy, két, három, illetve négy H-kötéssel stabilizált struktúrák is (8. táblázat).

A *transz*-EMk konformereiben a H-kötések többsége a Tyr<sup>1</sup>-Trp<sup>3</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>3</sup>, Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>4</sup>, Trp<sup>3</sup>-NH<sub>2</sub> (C-terminális amid-csoport) és Phe<sup>3</sup>-NH<sub>2</sub> (C-terminális amid-csoport) között alakul ki (9. és 10. táblázat). A Tyr<sup>1</sup>-Trp<sup>3</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>3</sup> és Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>4</sup>

aminosav párok molekulagerinc atomjai között kialakuló H-kötések arra engednek következtetni, hogy mind az N-terminális tripeptid régiókban (Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Trp<sup>3</sup> és Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup>), mind pedig a C-terminális tripeptid régiókban (Pro<sup>2</sup>-Trp<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> és Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup>) kialakulhatnak  $\gamma$ -turn másodlagos szerkezetek.

**8. táblázat** A *cisz*- és *transz*-EMk konformereinek eloszlása a kialakuló intramolekuláris H-kötések száma alapján.

	H-kötések száma				
	0	1	2	3	4
<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N-EM1	215	473	285	27	-
<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N-EM1	248	483	220	46	3
<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM1	263	457	248	32	-
<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM1	158	567	233	39	3
<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N-EM2	207	457	313	23	-
<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N-EM2	271	481	210	38	-
<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM2	227	452	279	41	1
<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM2	174	505	276	44	1

**9. táblázat** A *cisz*- és *transz*-EM1 konformereiben kialakuló intramolekuláris H-kötések száma.

	<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N-EM1		<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM1	
	H-kötések száma	H-kötések aránya / %	H-kötések száma	H-kötések aránya / %
Tyr <sup>1</sup> -Trp <sup>3</sup>	267	24,88	238	23,64
Tyr <sup>1</sup> -Phe <sup>4</sup>	96	8,95	97	9,63
Tyr <sup>1</sup> -NH <sub>2</sub>	79	7,36	45	4,47
Pro <sup>2</sup> -Phe <sup>4</sup>	238	22,18	248	24,63
Pro <sup>2</sup> -NH <sub>2</sub>	73	6,80	66	6,55
Trp <sup>3</sup> -NH <sub>2</sub>	320	29,83	313	31,08
	<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N-EM1		<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM1	
	H-kötések száma	H-kötések aránya / %	H-kötések száma	H-kötések aránya / %
Tyr <sup>1</sup> -Pro <sup>2</sup>	118	11,23	298	26,33
Tyr <sup>1</sup> -Trp <sup>3</sup>	95	9,04	226	19,96
Tyr <sup>1</sup> -Phe <sup>4</sup>	128	12,18	158	13,96
Tyr <sup>1</sup> -NH <sub>2</sub>	19	1,81	-	-
Pro <sup>2</sup> -Phe <sup>4</sup>	254	24,17	138	12,19
Pro <sup>2</sup> -NH <sub>2</sub>	84	7,99	53	4,68
Trp <sup>3</sup> -NH <sub>2</sub>	353	33,58	259	22,88

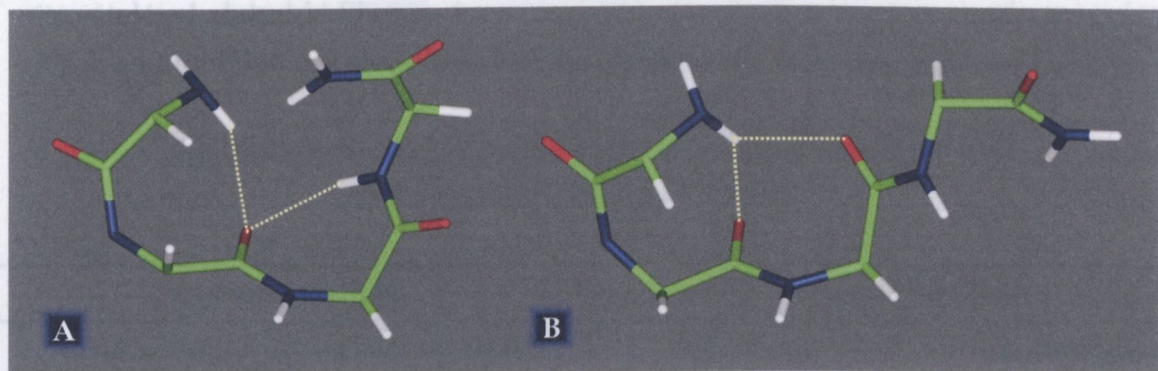
10. táblázat A *cisz*- és *transz*-EM2 konformereiben kialakuló intramolekuláris H-kötések száma.

	<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N-EM2		<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM2	
	H-kötések száma	H-kötések aránya / %	H-kötések száma	H-kötések aránya / %
Tyr <sup>1</sup> -Phe <sup>3</sup>	269	23,87	228	20,82
Tyr <sup>1</sup> -Phe <sup>4</sup>	102	9,05	147	13,42
Tyr <sup>1</sup> -NH <sub>2</sub>	97	8,61	46	4,20
Pro <sup>2</sup> -Phe <sup>4</sup>	248	22,01	276	25,21
Pro <sup>2</sup> -NH <sub>2</sub>	73	6,48	79	7,22
Phe <sup>3</sup> -NH <sub>2</sub>	338	29,98	319	29,13
	<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N-EM2		<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM2	
	H-kötések száma	H-kötések aránya / %	H-kötések száma	H-kötések aránya / %
Tyr <sup>1</sup> -Pro <sup>2</sup>	110	10,85	292	24,58
Tyr <sup>1</sup> -Phe <sup>3</sup>	113	11,14	219	18,43
Tyr <sup>1</sup> -Phe <sup>4</sup>	115	11,34	164	13,81
Tyr <sup>1</sup> -NH <sub>2</sub>	29	2,76	2	0,17
Pro <sup>2</sup> -Phe <sup>4</sup>	261	25,74	180	15,15
Pro <sup>2</sup> -NH <sub>2</sub>	75	7,40	45	3,79
Phe <sup>3</sup> -NH <sub>2</sub>	312	30,77	286	24,07

A *cisz*-EMk konformereiben viszont a H-kötések nagyrésze a Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>4</sup>, Trp<sup>3</sup>-NH<sub>2</sub> (C-terminális amid-csoport) és Phe<sup>3</sup>-NH<sub>2</sub> (C-terminális amid-csoport) között jön létre (9. és 10. táblázat). Ebben az esetben a Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>4</sup> aminosav pár molekulagerinc atomjai között létrejövő H-kötések azt mutatják, hogy a C-terminális tripeptid régiókban (Pro<sup>2</sup>-Trp<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> és Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup>) lehetőség van  $\gamma$ -turn struktúrák kialakulására. A *cisz*-H<sub>2</sub>N-EMk esetén a Tyr<sup>1</sup>-Trp<sup>3</sup> és Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>3</sup> aminosav párok között található H-kötések száma kisebb a *transz*-EMk-hoz képest, ezzel ellentétben a *cisz*-H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>-EMk konformereiben a *transz* izomerekhez hasonló arányban figyelhetők meg ezek a H-kötések. A *cisz* izomereknél a Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> aminosav pár között is meglehetősen sok H-kötés alakul ki, és ez egyrészt a Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> peptidkötés *cisz* helyzetével, másrészt az N-terminális NH<sub>3</sub><sup>+</sup> csoport jelenlétével magyarázható.

A *cisz*- és *transz*-EMk esetén kialakulhatnak H-kötések a Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>4</sup>, a Tyr<sup>1</sup>-NH<sub>2</sub> (C-terminális amid-csoport) és a Pro<sup>2</sup>-NH<sub>2</sub> (C-terminális amid-csoport) között is (9. és 10. táblázat), ami azt mutatja, hogy a molekulagerinc behajlik, és valamilyen turn szerkezetet vesz fel. A Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>4</sup> aminosav párok molekulagerinc atomjai közötti H-kötések meglátta a különféle  $\beta$ -turn másodlagos szerkezetek létezését támasztja alá.





14. ábra Bifurkált H-kötések. A: bifurkáció; B: inverz bifurkáció.

11. táblázat A *cisz*- és *transz*-EM1 konformereiben előforduló bifurkációk és inverz bifurkációk.

<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N-EM1				<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM1			
Bifurkáció		Inverz bifurkáció		Bifurkáció		Inverz bifurkáció	
Donor	Akceptor	Donor	Akceptor	Donor	Akceptor	Donor	Akceptor
Trp <sup>3</sup> -NH Phe <sup>4</sup> -NH	Tyr <sup>1</sup> -CO	NH <sub>2</sub> -NH	Tyr <sup>1</sup> -OH Pro <sup>2</sup> -CO	Trp <sup>3</sup> -NH NH <sub>2</sub> -NH	Tyr <sup>1</sup> -CO	NH <sub>2</sub> -NH	Tyr <sup>1</sup> -OH Pro <sup>2</sup> -CO
Trp <sup>3</sup> -NH NH <sub>2</sub> -NH	Tyr <sup>1</sup> -CO	NH <sub>2</sub> -NH	Tyr <sup>1</sup> -OH Trp <sup>3</sup> -CO	Phe <sup>4</sup> -NH NH <sub>2</sub> -NH	Tyr <sup>1</sup> -CO	NH <sub>2</sub> -NH	Tyr <sup>1</sup> -OH Trp <sup>3</sup> -CO
Phe <sup>4</sup> -NH NH <sub>2</sub> -NH	Tyr <sup>1</sup> -CO			Phe <sup>4</sup> -NH NH <sub>2</sub> -NH	Pro <sup>2</sup> -CO		
Phe <sup>4</sup> -NH NH <sub>2</sub> -NH	Tyr <sup>1</sup> -OH			Tyr <sup>1</sup> -NH NH <sub>2</sub> -NH	Trp <sup>3</sup> -CO		
Phe <sup>4</sup> -NH NH <sub>2</sub> -NH	Pro <sup>2</sup> -CO						
<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N-EM1				<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM1			
Bifurkáció		Inverz bifurkáció		Bifurkáció		Inverz bifurkáció	
Donor	Akceptor	Donor	Akceptor	Donor	Akceptor	Donor	Akceptor
Tyr <sup>1</sup> -NH Phe <sup>4</sup> -NH	Pro <sup>2</sup> -CO	Tyr <sup>1</sup> -NH	Pro <sup>2</sup> -CO Trp <sup>3</sup> -CO	Tyr <sup>1</sup> -NH Phe <sup>4</sup> -NH	Pro <sup>2</sup> -CO	Tyr <sup>1</sup> -NH	Pro <sup>2</sup> -CO Trp <sup>3</sup> -CO
Tyr <sup>1</sup> -NH NH <sub>2</sub> -NH	Pro <sup>2</sup> -CO	Tyr <sup>1</sup> -NH	Pro <sup>2</sup> -CO Phe <sup>4</sup> -CO	Tyr <sup>1</sup> -NH NH <sub>2</sub> -NH	Pro <sup>2</sup> -CO	Tyr <sup>1</sup> -NH	Pro <sup>2</sup> -CO Phe <sup>4</sup> -CO
Phe <sup>4</sup> -NH NH <sub>2</sub> -NH	Pro <sup>2</sup> -CO	Tyr <sup>1</sup> -NH	Trp <sup>3</sup> -CO Phe <sup>4</sup> -CO	Phe <sup>4</sup> -NH NH <sub>2</sub> -NH	Pro <sup>2</sup> -CO	Tyr <sup>1</sup> -NH	Trp <sup>3</sup> -CO Phe <sup>4</sup> -CO
Tyr <sup>1</sup> -NH NH <sub>2</sub> -NH	Trp <sup>3</sup> -CO	NH <sub>2</sub> -NH	Tyr <sup>1</sup> -OH Trp <sup>3</sup> -CO	Tyr <sup>1</sup> -NH NH <sub>2</sub> -NH	Trp <sup>3</sup> -CO	NH <sub>2</sub> -NH	Tyr <sup>1</sup> -OH Trp <sup>3</sup> -CO

A különböző turn struktúrákban előfordulhatnak ún. bifurkált H-kötések is (14. ábra). Bifurkáció jöhet létre két donor NH csoport és egy akceptor CO csoport között, míg az inverz bifurkáció két akceptor CO csoport és egy donor NH csoport

részvételével alakul ki [79,80]. Az endomorfinok mindkét izomere esetén megvizsgáltuk a különböző bifurkált H-kötések előfordulását (11. és 12. táblázat) [I,II].

12. táblázat A *cisz*- és *transz*-EM2 konformereiben előforduló bifurkációk és inverz bifurkációk.

<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N-EM2				<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM2			
Bifurkáció		Inverz bifurkáció		Bifurkáció		Inverz bifurkáció	
Donor	Akceptor	Donor	Akceptor	Donor	Akceptor	Donor	Akceptor
Phe <sup>3</sup> -NH NH <sub>2</sub> -NH	Tyr <sup>1</sup> -CO	Phe <sup>4</sup> -NH	Tyr <sup>1</sup> -CO Pro <sup>2</sup> -CO	Phe <sup>3</sup> -NH Phe <sup>4</sup> -NH	Tyr <sup>1</sup> -CO	Phe <sup>4</sup> -NH	Tyr <sup>1</sup> -CO Pro <sup>2</sup> -CO
Phe <sup>4</sup> -NH NH <sub>2</sub> -NH	Tyr <sup>1</sup> -CO	NH <sub>2</sub> -NH	Tyr <sup>1</sup> -CO Pro <sup>2</sup> -CO	Phe <sup>3</sup> -NH NH <sub>2</sub> -NH	Tyr <sup>1</sup> -CO	NH <sub>2</sub> -NH	Tyr <sup>1</sup> -OH Pro <sup>2</sup> -CO
Phe <sup>4</sup> -NH NH <sub>2</sub> -NH	Tyr <sup>1</sup> -OH	NH <sub>2</sub> -NH	Tyr <sup>1</sup> -OH Pro <sup>2</sup> -CO	Phe <sup>4</sup> -NH NH <sub>2</sub> -NH	Tyr <sup>1</sup> -CO	NH <sub>2</sub> -NH	Tyr <sup>1</sup> -OH Phe <sup>3</sup> -CO
Phe <sup>4</sup> -NH NH <sub>2</sub> -NH	Pro <sup>2</sup> -CO	NH <sub>2</sub> -NH	Tyr <sup>1</sup> -CO Phe <sup>3</sup> -CO	Phe <sup>4</sup> -NH NH <sub>2</sub> -NH	Pro <sup>2</sup> -CO		
		NH <sub>2</sub> -NH	Tyr <sup>1</sup> -OH Phe <sup>3</sup> -CO	Tyr <sup>1</sup> -NH NH <sub>2</sub> -NH	Phe <sup>3</sup> -CO		

<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N-EM2				<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM2			
Bifurkáció		Inverz bifurkáció		Bifurkáció		Inverz bifurkáció	
Donor	Akceptor	Donor	Akceptor	Donor	Akceptor	Donor	Akceptor
Tyr <sup>1</sup> -NH Phe <sup>4</sup> -NH	Pro <sup>2</sup> -CO	Tyr <sup>1</sup> -NH	Pro <sup>2</sup> -CO Phe <sup>3</sup> -CO	Tyr <sup>1</sup> -NH Phe <sup>4</sup> -NH	Pro <sup>2</sup> -CO	Tyr <sup>1</sup> -NH	Pro <sup>2</sup> -CO Phe <sup>3</sup> -CO
Tyr <sup>1</sup> -NH NH <sub>2</sub> -NH	Pro <sup>2</sup> -CO	Tyr <sup>1</sup> -NH	Pro <sup>2</sup> -CO Phe <sup>4</sup> -CO	Tyr <sup>1</sup> -NH NH <sub>2</sub> -NH	Pro <sup>2</sup> -CO	Tyr <sup>1</sup> -NH	Pro <sup>2</sup> -CO Phe <sup>4</sup> -CO
Phe <sup>4</sup> -NH NH <sub>2</sub> -NH	Pro <sup>2</sup> -CO	Tyr <sup>1</sup> -NH	Phe <sup>3</sup> -CO Phe <sup>4</sup> -CO	Phe <sup>4</sup> -NH NH <sub>2</sub> -NH	Pro <sup>2</sup> -CO	Tyr <sup>1</sup> -NH	Phe <sup>3</sup> -CO Phe <sup>4</sup> -CO
Tyr <sup>1</sup> -NH NH <sub>2</sub> -NH	Phe <sup>3</sup> -CO	NH <sub>2</sub> -NH	Tyr <sup>1</sup> -OH Phe <sup>3</sup> -CO	Tyr <sup>1</sup> -NH NH <sub>2</sub> -NH	Phe <sup>3</sup> -CO		
		NH <sub>2</sub> -NH	Pro <sup>2</sup> -CO Phe <sup>3</sup> -CO				

A *transz*-EMk esetén a bifurkációk többségénél a Trp<sup>3</sup>-NH, Phe<sup>3</sup>-NH, Phe<sup>4</sup>-NH és C-terminális NH<sub>2</sub>-NH a lehetséges donor csoportok, míg akceptorként leginkább a Tyr<sup>1</sup>-CO csoport fordul elő. Az inverz bifurkációknál az esetek nagyrésztében a C-terminális NH<sub>2</sub>-NH csoport szerepel donorként, míg akceptorként a Tyr<sup>1</sup>-CO, Tyr<sup>1</sup>-OH, Pro<sup>2</sup>-CO, Trp<sup>3</sup>-CO és Phe<sup>3</sup>-CO csoportok vesznek részt az intramolekuláris H-kötések kialakításában. A *cisz*-EMk esetén a bifurkációk nagyrésztében a Tyr<sup>1</sup>-NH, Phe<sup>4</sup>-NH és C-terminális NH<sub>2</sub>-NH fordul elő donorként, míg az akceptor szerepét leginkább a Pro<sup>2</sup>-CO csoport tölti be. Az inverz bifurkációknál főként a



Tyr<sup>1</sup>-NH és C-terminális NH<sub>2</sub>-NH a donor csoport, míg akceptorként a Tyr<sup>1</sup>-OH, Pro<sup>2</sup>-CO, Trp<sup>3</sup>-CO, Phe<sup>3</sup>-CO és Phe<sup>4</sup>-CO csoportok vesznek részt a H-kötések kialakításában.

A bifurkációkban és inverz bifurkációkban résztvevő donor és akceptor csoportok alapján látható, hogy az endomorfinek *cisz* és *transz* izomerei esetén különbség mutatkozik a különböző H-kötések irányai között, vagyis, hogy melyik aminosav vesz részt NH csoportjával donorként, illetve CO csoportjával akceptorként a különféle H-kötések kialakításában.

A Tyr<sup>1</sup>-Trp<sup>3</sup> és Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>3</sup> aminosav párok molekulagerinc atomjai között kialakuló H-kötések esetén a *transz*-EMk konformereiben a Trp<sup>3</sup>-NH és Phe<sup>3</sup>-NH csoportok szerepelnek donorként, míg a Tyr<sup>1</sup>-CO csoport az akceptor, vagyis a *transz* izomerek esetében főként 1←3 H-kötések alakulnak ki, azonban kisebb számban megfigyelhetők ellentétes irányú H-kötések is. A *cisz*-EMk konformereiben a Tyr<sup>1</sup>-Trp<sup>3</sup> és Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>3</sup> aminosav párok között létrejövő H-kötések kialakításában a Tyr<sup>1</sup>-NH csoport vesz részt donorként, míg a Trp<sup>3</sup>-CO és Phe<sup>3</sup>-CO csoportok akceptorként, vagyis a *cisz* izomerek esetén nagyrészt 1→3 H-kötések jönnek létre, azonban ebben az esetben is kialakulnak kisebb arányban ellentétes irányú H-kötések. Ezek az 1→3 H-kötések nagyobb számban jelennek meg a töltött N-terminálissal rendelkező *cisz*-EMk konformereiben, mint a semleges N-terminálisú *cisz* izomerek konformerei esetén, és ez a jelenség az N-terminális NH<sub>3</sub><sup>+</sup> csoport jelenlétével magyarázható.

A Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>4</sup> aminosav pár molekulagerinc atomjai között kialakuló H-kötések esetén is megfigyelhető, hogy egyrészt kialakulhat 1←4 H-kötés, amelyben a Phe<sup>4</sup>-NH csoport a donor és a Tyr<sup>1</sup>-CO csoport az akceptor, illetve létrejöhet 1→4 H-kötés is, amelyben a Tyr<sup>1</sup>-NH csoport szerepel donorként, míg a Phe<sup>4</sup>-CO csoport akceptorként. Mind a *cisz*, mind a *transz* izomerek konformereiben megfigyelhető mindkét irányú H-kötés, azonban a *transz*-EMk esetén túlnyomórészt 1←4 H-kötések alakulnak ki, míg a *cisz*-EMk-nál az 1→4 H-kötések aránya a nagyobb. A töltött N-terminálissal rendelkező *cisz*- és *transz*-EMk esetén kissé megnövekszik az 1→4 H-kötések száma a semleges N-terminálisú tetrapeptidekhez képest, és ez szintén az N-terminális NH<sub>3</sub><sup>+</sup> csoport hatásával magyarázható.

A *cisz*- és *transz*-EMk konformereiben a molekulagerinc atomok között kialakuló H-kötések mellett megfigyelhetők olyan H-kötések is, amelyek a molekulagerinc és oldallánc atomok részvételével alakulnak ki. Az endomorfinek felépítő aminosavak oldalláncai esetén a Tyr<sup>1</sup> OH csoportja vesz részt akceptorként a molekulagerinc-oldallánc H-kötések kialakításában, és bifurkáció esetén a Phe<sup>4</sup>-NH és C-terminális NH<sub>2</sub>-NH csoportok szerepelnek donorként, míg inverz bifurkáció esetén a C-terminális NH<sub>2</sub>-NH a donor csoport.



3.5. Másodlagos szerkezetek

Az endomorfinek molekulagerinc atomjai között kialakuló intramolekuláris H-kötések alapján arra lehet következtetni, hogy ezen tetrapeptidek konformereiben előfordulnak különböző típusú  $\beta$ - és  $\gamma$ -turn struktúrák. A  $\beta$ -turn-ök négy egymást követő aminosavból álló másodlagos szerkezeti elemek, amelyeket  $1 \leftarrow 4$  H-kötés stabilizál, vagyis az  $i+3$  aminosav NH csoportja szerepel donorként, és az  $i$  aminosav CO csoportja vesz részt akceptorként a H-kötés kialakításában. A különböző típusú  $\beta$ -turn-ök meghatározását a két középső aminosav  $\Phi$  és  $\Psi$  torziós szögeire ( $\Phi_2$ ,  $\Psi_2$ ,  $\Phi_3$  és  $\Psi_3$ ) vonatkozó, és az adott típusú  $\beta$ -turn-re karakterisztikus szögtartományok alkalmazásával végeztük el [81,82] (13. táblázat).

13. táblázat A különböző típusú  $\beta$ - és  $\gamma$ -turn-ök  $\Phi$  és  $\Psi$  torziós szögeinek karakterisztikus szögtartományai.

$\beta$ -turn				
	$\Phi_2$	$\Psi_2$	$\Phi_3$	$\Psi_3$
I típus	$-60 \pm 30$	$-30 \pm 30$	$-90 \pm 30$	$0 \pm 30$
II típus	$-60 \pm 30$	$120 \pm 30$	$80 \pm 30$	$0 \pm 30$
III típus	$-60 \pm 30$	$-30 \pm 30$	$-60 \pm 30$	$-30 \pm 30$
V típus	$-80 \pm 30$	$80 \pm 30$	$80 \pm 30$	$-80 \pm 30$
$\gamma$ -turn (1)				
	N-terminális $\gamma$ -turn		C-terminális $\gamma$ -turn	
	$\Phi_2$	$\Psi_2$	$\Phi_3$	$\Psi_3$
$\gamma$ -turn	-	-	70 - 85	$(-70) - (-60)$
inverz $\gamma$ -turn	$(-85) - (-70)$	60 - 70	$(-85) - (-70)$	60 - 70
$\gamma$ -turn (2)				
	N-terminális $\gamma$ -turn		C-terminális $\gamma$ -turn	
	$\Phi_2$	$\Psi_2$	$\Phi_3$	$\Psi_3$
$\gamma$ -turn	-	-	70 - 95	$(-75) - (-45)$
inverz $\gamma$ -turn	$(-95) - (-70)$	45 - 75	$(-95) - (-70)$	45 - 75

A  $\gamma$ -turn struktúrákat három egymás után következő aminosav határozza meg, és ezen szerkezeti elemeket ( $\gamma$ -turn és inverz  $\gamma$ -turn)  $1 \leftarrow 3$  H-kötés stabilizálja, vagyis az  $i+2$  aminosav NH csoportja donorként, míg az  $i$  aminosav CO csoportja akceptorként vesz részt a H-kötés kialakításában. A  $\gamma$ - és inverz  $\gamma$ -turn-ök meghatározásakor a középső aminosav  $\Phi$  és  $\Psi$  torziós szögeire ( $\Phi_2$ ,  $\Psi_2$  vagy  $\Phi_3$ ,  $\Psi_3$ ) vonatkozó, és ezen turn struktúrákra jellemző szögtartományokat alkalmaztuk (13. táblázat). A  $\gamma$ - és inverz  $\gamma$ -turn-ök azonosítása során kétfajta  $\Phi$  és  $\Psi$  szögtarto-

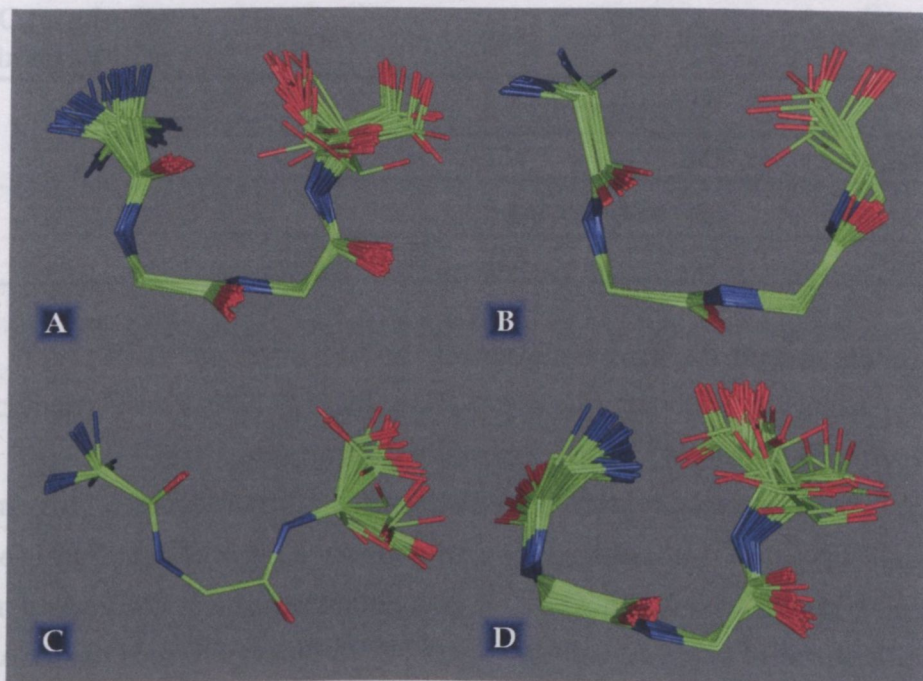
mányt használtunk, amelyek közül az egyik egy szűkebb intervallumot ( $\gamma$ -turn:  $70^\circ < \Phi < 85^\circ$ ,  $-70^\circ < \Psi < -60^\circ$ ; inverz  $\gamma$ -turn:  $-85^\circ < \Phi < -70^\circ$ ,  $60^\circ < \Psi < 70^\circ$ ) [83,84], míg a másik egy tágabb intervallumot ( $\gamma$ -turn:  $70^\circ < \Phi < 95^\circ$ ,  $-75^\circ < \Psi < -45^\circ$ ; inverz  $\gamma$ -turn:  $-95^\circ < \Phi < -70^\circ$ ,  $45^\circ < \Psi < 75^\circ$ ) [85,86,87] jelent. Az EM1 és EM2 mindkét izomere esetén meghatároztuk a tetrapeptidekben előforduló  $\beta$ - és  $\gamma$ -turn-ök típusait, illetve azok populációinak nagyságát (14. és 15. táblázat) [I,II,IV].

**14. táblázat** A *cisz*- és *transz*-EM1 konformereiben előforduló másodlagos szerkezetek.

	<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N- EM1	<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N- EM1	<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> - EM1	<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> - EM1
<b><math>\beta</math>-turn</b>				
I típus	8	8	12	2
II típus	1	-	2	-
III típus	119	83	51	33
V típus	25	-	21	-
<b><math>\gamma</math>-turn (1)</b>				
N-terminális inverz $\gamma$ -turn	46	-	48	-
C-terminális $\gamma$ -turn	36	33	26	37
C-terminális inverz $\gamma$ -turn	50	78	67	23
<b><math>\gamma</math>-turn (2)</b>				
N-terminális inverz $\gamma$ -turn	155	-	115	-
C-terminális $\gamma$ -turn	69	52	60	47
C-terminális inverz $\gamma$ -turn	116	136	145	57
<b><math>\beta</math>-turn+<math>\gamma</math>-turn (1)</b>				
	285	202	227	95
<b><math>\beta</math>-turn+<math>\gamma</math>-turn (2)</b>				
	493	279	406	139

A  $\beta$ -turn struktúrák közül a *transz*-EMk esetén legnagyobb arányban a III és V típusú  $\beta$ -turn-ök alakulnak ki (15. ábra), míg a *cisz*-EMk esetében a III típusú  $\beta$ -turn-ök populációja a legnagyobb (15. ábra), ugyanakkor a *cisz* izomerek konformereiben egyáltalán nem fordulnak elő V típusú  $\beta$ -turn szerkezeti elemek. A tetrapeptidekben kialakuló  $\beta$ -turn struktúrák többségét 1 $\leftarrow$ 4 H-kötés stabilizálja, amely-

nek kialakításában a Phe<sup>4</sup>-NH csoport szerepel donorként, míg a Tyr<sup>1</sup>-CO csoport akceptorként. Az endomorfinek mindkét izomere esetén megfigyelhető, hogy a töltött N-terminálissal rendelkező peptidek konformereiben kisebb arányban jelennek meg a fent említett  $\beta$ -turn struktúrák, mint a semleges N-terminálisú molekulák esetében. Ez a jelenség kapcsolatba hozható a tetrapeptidekben kialakuló intramolekuláris H-kötések számával, ugyanis a protonált N-terminálissal rendelkező EM1 és EM2 esetén kismértékben megnövekszik az 1 $\rightarrow$ 4 H-kötések aránya a semleges N-terminálisú endomorfinekhez képest, és ezzel párhuzamosan lecsökken a 1 $\leftarrow$ 4 H-kötések száma, amelyek szerepet játszanak a különböző típusú  $\beta$ -turn-ök stabilizálásában. Az EM1 és EM2 konformereiben előforduló  $\beta$ -turn struktúrák között található olyan másodlagos szerkezeti elemek is, amelyek megfelelnek a  $\Phi$  és  $\Psi$  torziós szögekre vonatkozó kritériumoknak, azonban nem alakul ki bennük a stabilizáló intramolekuláris 1 $\leftarrow$ 4 H-kötés. Ezek a H-kötés nélküli  $\beta$ -turn-ök nagyobb arányban figyelhetők meg a *cisz*-EMk esetén, mint a *transz*-EMk konformereiben. Ez szintén összefüggésbe hozható a két izomer esetében kialakuló különböző irányú intramolekuláris H-kötések populációinak nagyságával, ugyanis a *cisz*-EMk-ban nagyobb az 1 $\rightarrow$ 4 H-kötések aránya a *transz*-EMk-kal összehasonlítva, ez pedig a  $\beta$ -turn-öket stabilizáló 1 $\leftarrow$ 4 H-kötések számának csökkenését eredményezi.



15. ábra A *transz*-H<sub>2</sub>N-EM2 konformereiben kialakuló III (A) és V (B) típusú  $\beta$ -turn-ök, valamint N-terminális inverz  $\gamma$ -turn-ök (C), illetve a *cisz*-H<sub>2</sub>N-EM2 konformereiben kialakuló III típusú  $\beta$ -turn-ök (D).

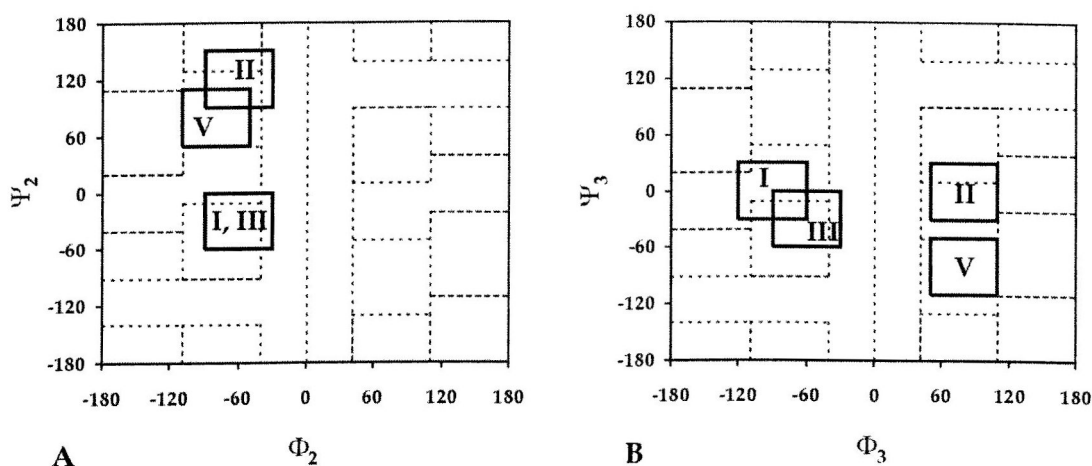


15. táblázat A *cisz*- és *transz*-EM2 konformereiben előforduló másodlagos szerkezetek.

	<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N- EM2	<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N- EM2	<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> - EM2	<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> - EM2
<b>β-turn</b>				
I típus	15	7	13	2
II típus	1	1	2	-
III típus	97	82	75	53
V típus	27	-	25	-
<b>γ-turn (1)</b>				
N-terminális inverz γ-turn	71	-	56	-
C-terminális γ-turn	32	32	43	38
C-terminális inverz γ-turn	47	62	59	45
<b>γ-turn (2)</b>				
N-terminális inverz γ-turn	165	-	124	-
C-terminális γ-turn	81	54	84	53
C-terminális inverz γ-turn	124	131	134	84
<b>β-turn+γ-turn (1)</b>				
	290	184	273	138
<b>β-turn+γ-turn (2)</b>				
	510	275	457	192

A *transz*-EMk konformereiben háromféle γ-turn struktúra alakul ki nagy populációban. Ezek közül az egyik az N-terminális tripeptid régiókban (Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Trp<sup>3</sup> és Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup>) megfigyelhető inverz γ-turn (N-terminális inverz γ-turn) (15. ábra), míg a másik kettő a C-terminális tripeptid régiókban (Pro<sup>2</sup>-Trp<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> és Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup>) található γ- és inverz γ-turn (C-terminális γ- és inverz γ-turn). Ezzel szemben a *cisz*-EMk konformereiben csak a C-terminális γ- és inverz γ-turn másodlagos szerkezeti elemek fordulnak elő nagy számban, míg az N-terminális inverz γ-turn struktúrák teljesen hiányoznak. Az N-terminális tripeptid régiókban kialakuló inverz γ-turn-öket a Trp<sup>3</sup>-NH és Phe<sup>3</sup>-NH donor csoportok, valamint a Tyr<sup>1</sup>-CO akceptor csoport között kialakuló 1←3 H-kötések stabilizálják. A C-terminális tripeptid régiókban megfigyelhető γ- és inverz γ-turn-ök stabilizálásában pedig 2←4 H-kötések vesznek részt, amelyeket a Phe<sup>4</sup>-NH donor csoport és a Pro<sup>2</sup>-CO

akceptor csoport alakít ki. Az N-terminális inverz  $\gamma$ -turn struktúrák hiánya a *cisz*-EMk esetén összefüggésbe hozható a különböző irányú intramolekuláris H-kötések populációinak nagyságával. A *transz*-EMk konformereiben ugyanis a Trp<sup>3</sup>-NH és Phe<sup>3</sup>-NH csoportok szerepelnek donorként, míg a Tyr<sup>1</sup>-CO csoport az akceptor, vagyis a *transz* izomerek esetén főként 1 $\leftarrow$ 3 H-kötések alakulnak ki, és ezek stabilizálják az N-terminális tripeptid régiókban kialakuló inverz  $\gamma$ -turn-öket. Ezzel ellentétben a *cisz*-EMk konformereiben a H-kötések kialakításában a Tyr<sup>1</sup>-NH csoport vesz részt donorként, míg a Trp<sup>3</sup>-CO és Phe<sup>3</sup>-CO csoportok akceptorként, vagyis a *cisz* izomerek esetén nagyrészt 1 $\rightarrow$ 3 H-kötések jönnek létre, amelyek nem vesznek részt az inverz  $\gamma$ -turn struktúrák stabilizálásában, tehát ezzel magyarázható az inverz  $\gamma$ -turn-ök hiánya az endomorfinek *cisz* izomerei esetén.



**16. ábra** A  $\Phi_2$ - $\Psi_2$  (A) és  $\Phi_3$ - $\Psi_3$  (B) felszín konformációs tartományai, valamint a különböző típusú  $\beta$ -turn-ök karakterisztikus szögtartományai.

A *cisz*- és *transz*-EMk konformereiben kialakuló  $\beta$ - és  $\gamma$ -turn-ök összesített száma alapján megállapítható, hogy a *transz* izomerek esetén nagyobb arányban jelennek meg a különböző turn struktúrák, mint a *cisz* izomerek esetében. Ennek oka elsődlegesen a *transz*-EMk konformereiben kialakuló V típusú  $\beta$ -turn-ök, és N-terminális inverz  $\gamma$ -turn-ök populációi, amelyek a *cisz*-EMk konformerei esetén teljesen hiányoznak. Ha összevetjük a különböző típusú  $\beta$ -turn struktúrák karakterisztikus szögtartományait a  $\Phi_i$ - $\Psi_i$  felszín konformációs tartományjaival, akkor azt állapíthatjuk meg, hogy a III és V típusú  $\beta$ -turn-ök szögtartományai a  $\Phi_2$ - $\Psi_2$  Ramachandran ábra A és C altereivel, valamint a  $\Phi_3$ - $\Psi_3$  Ramachandran ábra A és C\* altereivel kerülnek fedésbe (16. ábra). Mind a *cisz*-, mind a *transz*-EMk esetén megfigyelhetők nagy konformer populációk a  $\Phi_2$ - $\Psi_2$  és  $\Phi_3$ - $\Psi_3$  Ramachandran ábrák A altereiben, és ezzel összefüggésben az endomorfinek mindkét izomere esetében megjelennek a III típusú  $\beta$ -turn-ök. Mivel azonban a *cisz*-EMk esetén a  $\Phi_2$ - $\Psi_2$

Ramachandran ábrákon a C tartomány kevésbé preferált a *transz*-EMk-hoz képest, így ezzel magyarázható, hogy a *cisz* izomerek esetében kevesebb  $\beta$ -turn struktúra alakul ki, vagyis ezekben a konformerekben nem található meg az V típusú  $\beta$ -turn. Az N-terminális inverz  $\gamma$ -turn-re jellemző szögtartományt összevetve a  $\Phi_2$ - $\Psi_2$  Ramachandran ábra altereivel azt tapasztaljuk, hogy az inverz  $\gamma$ -turn-re karakterisztikus tartomány a C altérrel fed át. A *cisz*-EMk esetén a  $\Phi_2$ - $\Psi_2$  Ramachandran ábrákon ez a tartomány kevésbé preferált, így ez az oka az N-terminális inverz  $\gamma$ -turn hiányának a *cisz* izomerek esetében.

A *transz*-EMk esetén az egy  $\beta$ - vagy  $\gamma$ -turn-t tartalmazó konformerek mellett megfigyelhetők különböző ún. átfedő turn struktúrával rendelkező szerkezetek is [IV]. Ezek között találhatók olyan konformerek, amelyek egy N-terminális inverz  $\gamma$ -turn-t és egy C-terminális  $\gamma$ - vagy inverz  $\gamma$ -turn-t tartalmaznak egyidejűleg. Az N-terminális inverz  $\gamma$ -turn-nel és C-terminális  $\gamma$ -turn-nel egyidőben jellemezhető szerkezetek közül néhány ugyanakkor V típusú  $\beta$ -turn-nel is rendelkezik. Ennek oka abban keresendő, hogy az V típusú  $\beta$ -turn  $\Phi_2$ ,  $\Psi_2$ ,  $\Phi_3$  és  $\Psi_3$  torziós szögeire vonatkozó szögtartományok részben átfednek az N-terminális inverz  $\gamma$ -turn  $\Phi_2$  és  $\Psi_2$  torziós szögeire, valamint a C-terminális  $\gamma$ -turn  $\Phi_3$  és  $\Psi_3$  torziós szögeire karakterisztikus szögtartományokkal. Annak megfelelően, hogy milyen típusú turn-ök vesznek részt az átfedő turn struktúrák kialakításában, különböző átfedő turn-ök jöhetnek létre: inverz  $\gamma$  -  $\gamma$  (N-terminális inverz  $\gamma$ -turn és C-terminális  $\gamma$ -turn), inverz  $\gamma$  - inverz  $\gamma$  (N-terminális inverz  $\gamma$ -turn és C-terminális inverz  $\gamma$ -turn), inverz  $\gamma$  -  $\beta$  (N-terminális inverz  $\gamma$ -turn és V típusú  $\beta$ -turn), illetve  $\beta$  -  $\gamma$  (V típusú  $\beta$ -turn és C-terminális  $\gamma$ -turn). A *cisz*-EMk konformereiben nem figyelhetők meg hasonló átfedő turn struktúrák, hiszen ebben az esetben csak a C-terminális  $\gamma$ - vagy inverz  $\gamma$ -turn-ök jelennek meg a konformerekben, míg az N-terminális inverz  $\gamma$ -turn és V típusú  $\beta$ -turn másodlagos szerkezeti elemek teljesen hiányoznak.

### 3.6. Aromás-aromás kölcsönhatások

#### 3.6.1. Aromás-aromás kölcsönhatások meghatározása

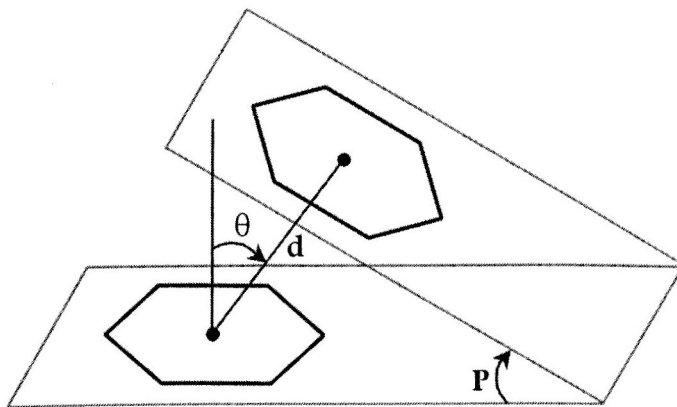
Az endomorfinek az egyes, hármas és négyes pozíciókban aromás aminosavakat tartalmaznak (EM1: Tyr<sup>1</sup>, Trp<sup>3</sup>, Phe<sup>4</sup>; EM2: Tyr<sup>1</sup>, Phe<sup>3</sup>, Phe<sup>4</sup>), amelyek kölcsönhatásba léphetnek egymással, és az így kialakuló aromás-aromás kölcsönhatások stabilizálhatják ezen tetrapeptidek különböző konformereit.

Az aromás-aromás kölcsönhatások azonosításához az endomorfinek Tyr<sup>1</sup>, Trp<sup>3</sup>/Phe<sup>3</sup> és Phe<sup>4</sup> aminosavai esetén meghatároztuk az oldalláncok gyűrűinek geometriai középpontjait (centroidjait). A Tyr és Phe aminosavak esetében a hatagú fenil gyűrű alapján definiáltuk a centroidokat, míg a Trp aminosavnál az indol



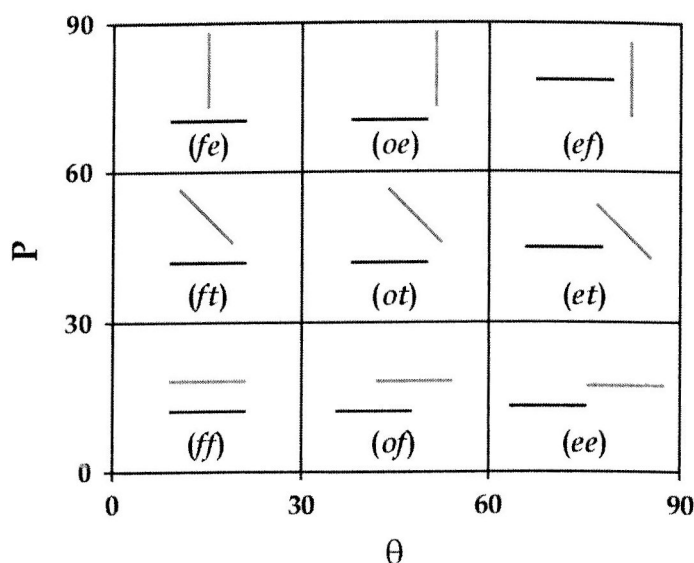
oldallánc öt- (Trp(5)) és hattagú (Trp(6)) gyűrűjét külön-külön vettük figyelembe. Ezt követően megmértük a centroidok egymáshoz viszonyított távolságait ( $d$ ) (17. ábra), és azokat a kölcsönhatásokat tekintettük aromás-aromás kölcsönhatásnak, amelyekben a két gyűrű centroidja között mért távolság kisebb volt 5,5 Å-nél.

A kölcsönható aromás oldalláncok egymáshoz viszonyított geometriai orientációjának meghatározásához két paramétert számítottunk ki [88,89], amelyek közül az egyik az aromás gyűrűk síkjai által bezárt szög ( $P$ ) (17. ábra). A Tyr, Trp(6) és Phe esetén a hattagú gyűrűk alapján, míg a Trp(5) esetében az öttagú gyűrű alapján határoztuk meg a síkokat. A másik paraméter pedig a két kölcsönható aromás gyűrű centroidjait összekötő egyenes és a referencia gyűrű síkjára állított normális által bezárt szög ( $\theta$ ) (17. ábra). A normális az aromás gyűrű centroidján halad keresztül, és referencia gyűrűként minden esetben a kisebb szekvenciaszámmal rendelkező aromás aminosav gyűrűje szerepelt.



**17. ábra** Az aromás-aromás kölcsönhatások meghatározásához, valamint a kölcsönható aromás oldalláncok egymáshoz viszonyított geometriai orientációjának azonosításához alkalmazott paraméterek ( $d$ ,  $P$  és  $\theta$ ).

A  $P$  és  $\theta$  paraméterek alapján karakterizálható a kölcsönható aromás gyűrűk relatív térbeli elrendeződése, és ezen két szög különböző kombinációinak megfelelően az aromás-aromás kölcsönhatásban résztvevő gyűrűk kilenc különféle geometriai orientációja különböztethető meg, amelyek mindegyikét két betűvel jelöljük [89]: *ff*, *of*, *ee*, *ft*, *ot*, *et*, *fe*, *oe* és *ef* (18. ábra). Az első betű a referencia gyűrűre vonatkozik, és megmutatja, hogy ez a gyűrű a lapjával (*face*, *f*), avagy a szélével (*edge*, *e*) vesz-e részt az aromás-aromás kölcsönhatásban, vagy a kölcsönható gyűrű centroidja eltolt pozícióban (*offset*, *o*) helyezkedik-e el a referencia gyűrű centroidjához képest. A második betű a kölcsönhatásban résztvevő másik gyűrűre vonatkozik, és azt mutatja meg, hogy ez a gyűrű dőlt helyzetben (*tilted*, *t*) van-e a referencia gyűrűhöz viszonyítva, vagy az aromás-aromás kölcsönhatásban a lapjával (*face*, *f*), avagy a szélével (*edge*, *e*) vesz-e részt.



**18. ábra** Az aromás-aromás és prolin-aromás kölcsönhatások különféle geometriai orientációi a  $P$  és  $\theta$  paraméterek különböző kombinációinak megfelelően. A kölcsönható aromás és prolin-aromás párok esetén a fekete vonal a referencia gyűrű síkját, míg a szürke vonal a kölcsönhatásban résztvevő másik gyűrű síkját jelöli.

A kölcsönható aromás gyűrűk fent említett kilenc geometriája megfeleltethető az aromás-aromás kölcsönhatások egy másfajta osztályozásának [90]. Az *ff* orientáció megfelel a *fully stacking* vagy *face-to-face* („teljes *stacking*” vagy „szemtől szembe”) kölcsönhatásnak, az *of* geometria azonos a *staggered stacking* („lépcsős *stacking*”) kölcsönhatással, míg az *ee* orientáció megfelel a *parallel in-plane* („síkbán párhuzamos”) kölcsönhatásnak. Az *ft*, *ot* és *et* geometriák a *tilted* („dőlt”) kölcsönhatások csoportjába tartoznak, az *fe* és *ef* orientációk megfelelnek a *edge-to-face* vagy *T-shaped* („széltől szembe” vagy „T-alakú”) kölcsönhatásoknak, végül az *oe* geometria azonos a *cogwheel* vagy *L-shaped* („fogaskerék” vagy „L-alakú”) kölcsönhatással.

### 3.6.2. Tyr-Trp, Tyr-Phe, Trp-Phe és Phe-Phe kölcsönhatások

Az endomorfinek Tyr<sup>1</sup>, Trp<sup>3</sup>/Phe<sup>3</sup> és Phe<sup>4</sup> aromás aminosavai esetén megvizsgáltuk az oldalláncok között kialakuló aromás-aromás kölcsönhatásokat: Tyr<sup>1</sup>-Trp(5)<sup>3</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Trp(6)<sup>3</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>3</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>4</sup>, Trp(5)<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup>, Trp(6)<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup>, Phe<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> (a Trp(5) a triptofán indol oldalláncának öttagú gyűrűjét, míg a Trp(6) az oldallánc hattagú gyűrűjét jelöli). A különböző aminosav párok esetében meghatároztuk az aromás-aromás kölcsönhatások populációinak nagyságát (16. táblázat), továbbá a kölcsönható aromás gyűrűk preferált geometriai orientációit (17. és 18. táblázat) [IV].

**16. táblázat** A *cisz*- és *transz*-EMk Tyr<sup>1</sup>, Trp<sup>3</sup>/Phe<sup>3</sup> és Phe<sup>4</sup> aminosavainak aromás oldalláncai között kialakuló aromás-aromás kölcsönhatások populációi. A zárójelben lévő számok a kölcsönható aromás párokat tartalmazó konformerek %-os arányait mutatják.

	<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N- EM1	<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N- EM1	<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> - EM1	<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> - EM1
Tyr <sup>1</sup> -Trp(5) <sup>3</sup>	396 (40)	70 (14)	248 (34)	158 (29)
Tyr <sup>1</sup> -Trp(6) <sup>3</sup>	301 (31)	99 (19)	225 (30)	183 (34)
Tyr <sup>1</sup> -Phe <sup>4</sup>	181 (18)	80 (16)	135 (18)	60 (11)
Trp(5) <sup>3</sup> -Phe <sup>4</sup>	128 (13)	110 (21)	291 (39)	91 (17)
Trp(6) <sup>3</sup> -Phe <sup>4</sup>	114 (12)	68 (13)	279 (38)	75 (14)
	<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N- EM2	<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N- EM2	<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> - EM2	<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> - EM2
Tyr <sup>1</sup> -Phe <sup>3</sup>	306 (31)	106 (14)	356 (36)	118 (22)
Tyr <sup>1</sup> -Phe <sup>4</sup>	165 (17)	131 (17)	157 (16)	51 (10)
Phe <sup>3</sup> -Phe <sup>4</sup>	278 (28)	134 (17)	263 (26)	59 (11)

A *transz*-EMk konformerei esetén a különböző aromás-aromás kölcsönhatások nagyobb számban fordulnak elő, mint a *cisz*-EMk konformereiben. Emellett a *transz*-EM2 esetében a Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>3</sup> és Phe<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönhatások populációi nagyobbak, összehasonlítva a Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönható párok számával. A *transz*-H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>-EM1 esetén a Tyr<sup>1</sup>-Trp<sup>3</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>4</sup> és Trp<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönhatások hasonló arányai figyelhetők meg, azonban a *transz*-H<sub>2</sub>N-EM1 esetében a Trp<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönható párok száma kisebb, mint a *transz*-H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>-EM1-nél.

Attól függően, hogy a Trp<sup>3</sup> aminosav öt- (Trp(5)<sup>3</sup>) vagy hattagú (Trp(6)<sup>3</sup>) gyűrűjét vettük figyelembe az aromás-aromás kölcsönhatások meghatározásakor, eltérő számú kölcsönható aromás pár figyelhető meg az EM1 konformereiben. A *transz*-EM1 esetén a Tyr<sup>1</sup>-Trp(5)<sup>3</sup> kölcsönhatások száma nagyobb, mint a Tyr<sup>1</sup>-Trp(6)<sup>3</sup> kölcsönható párok száma, míg a *cisz*-EM1-nél ezen két kölcsönhatás populációi közötti viszony fordított. Az EM1 mindkét izomere esetében a Trp(5)<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönhatások nagyobb számban fordulnak elő, mint a Trp(6)<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönható párok. Ezen különbségek ellenére azonban vannak átfedések a fent említett kölcsönhatások között, ugyanis a Tyr<sup>1</sup>-Trp(5)<sup>3</sup> és Trp(5)<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönhatások 56-88 %-a esetén a Trp(6)<sup>3</sup> gyűrű és a kölcsönható aromás gyűrű centroidjainak távolsága szintén kisebb 5,5 Å-nél. Ugyanakkor a Tyr<sup>1</sup>-Trp(6)<sup>3</sup> és Trp(6)<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönható párok 56-92 %-ában a Trp(5)<sup>3</sup> gyűrű és a kölcsönhatásban résztvevő másik aromás gyűrű centroidjai között mért távolság esetén szintén teljesül az 5,5 Å kritérium.



17. táblázat A *cisz-* és *transz*-EM1 Tyr<sup>1</sup>-Trp(5)<sup>3</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Trp(6)<sup>3</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>4</sup>, Trp(5)<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> és Trp(6)<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönható aromás párjainak különböző geometriai orientációi a 18. ábra szerinti táblázatba rendezve.

<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N-EM1			<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N-EM1			<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM1			<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM1		
Tyr <sup>1</sup> -Trp(5) <sup>3</sup>											
9	43	33	-	1	18	-	7	13	-	4	22
58	87	65	37	-	-	11	24	28	115	7	-
11	90	-	11	3	-	2	161	2	4	6	-
Tyr <sup>1</sup> -Trp(6) <sup>3</sup>											
11	9	32	1	3	20	6	4	8	-	6	14
49	78	32	42	7	13	12	22	15	128	13	7
19	50	21	7	6	-	45	102	11	5	10	-
Tyr <sup>1</sup> -Phe <sup>4</sup>											
7	35	45	22	19	3	1	21	23	15	25	2
16	12	20	16	7	-	29	12	30	6	-	-
11	35	-	5	8	-	9	10	-	1	11	-
Trp(5) <sup>3</sup> -Phe <sup>4</sup>											
11	-	11	12	6	9	4	4	12	12	4	8
15	31	2	3	36	11	27	112	9	5	28	5
53	5	-	25	8	-	106	17	-	15	14	-
Trp(6) <sup>3</sup> -Phe <sup>4</sup>											
8	2	8	8	1	3	11	1	3	6	1	2
17	20	2	4	13	6	44	92	3	7	26	2
38	19	-	27	6	-	88	37	-	29	2	-

A *transz*-H<sub>2</sub>N-EM1-nél a Tyr<sup>1</sup>-Trp(5)<sup>3</sup> és Tyr<sup>1</sup>-Trp(6)<sup>3</sup> kölcsönható párok esetén, valamint a *transz*-EM2-nél a Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>3</sup> kölcsönhatások esetében a különböző geometriai orientációk körülbelül azonos eloszlásokat mutatnak. Ezekben az esetekben a preferált geometriák a *staggered stacking (of)*, a *tilted* orientáció különböző típusai (*ft*, *ot*, *et*) és az *ef* (19. ábra). A *transz*-H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>-EM1-nél a Tyr<sup>1</sup>-Trp(5)<sup>3</sup> és Tyr<sup>1</sup>-Trp(6)<sup>3</sup> kölcsönhatások esetén azonban a fent leírttól eltérő eloszlás figyelhető meg, és ezen kölcsönható pároknál leginkább a *staggered stacking (of)* orientáció alakul ki. A *cisz*-EMk-nál túlnyomórészt az *ft* geometria jelenik meg (19. ábra), és ezen orientációk száma magasabb a töltött N-terminálissal rendelkező *cisz*-EMk esetén, mint a semleges N-terminálisú *cisz* izomereknél.

Az EMk mindkét izomere esetén a Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönhatások tekintetében a különféle geometriák eloszlásai némileg különböznek egymástól.

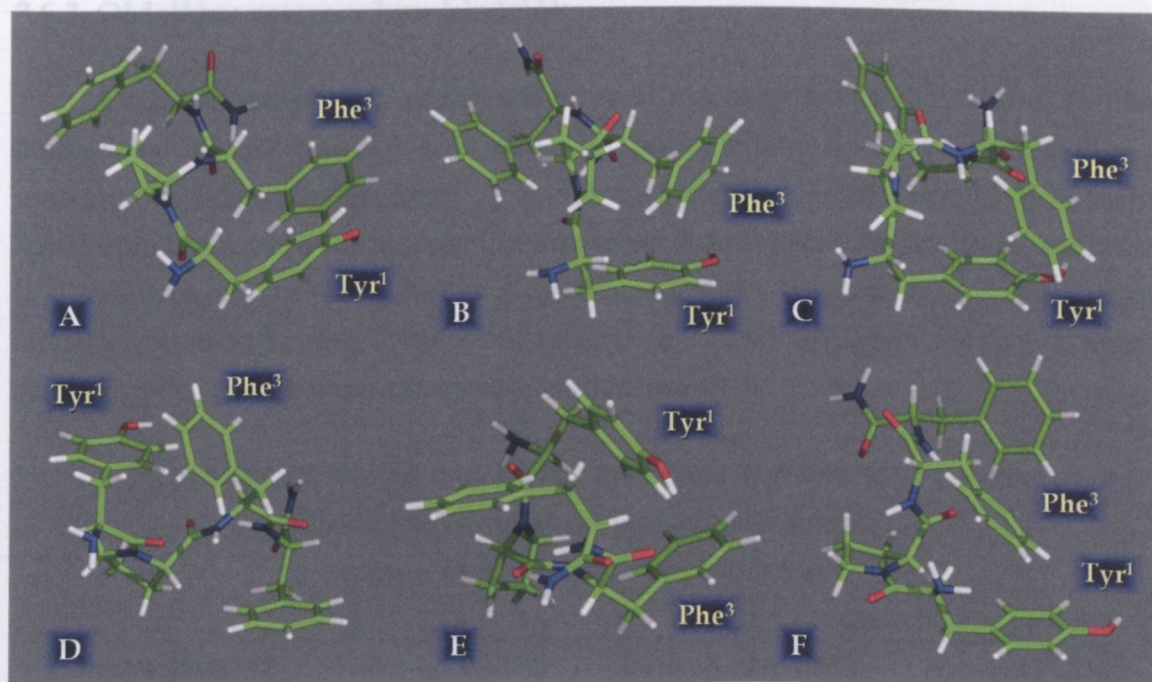
A *transz*-EM1-nél a Trp(5)<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> és Trp(6)<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönható párok esetében a különböző geometriai orientációk eloszlásai különböznek azoktól, amelyek a *transz*-EM2-nél a Phe<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönhatások esetén figyelhetők meg. Az előbbi esetben a preferált geometriák a *fully stacking* (*ff*) és az *ot*, míg az utóbbi esetben főként a *fully stacking* (*ff*), valamint az *edge-to-face* orientáció két típusa (*fe*, *ef*) figyelhető meg (20. ábra). A *cisz*-EM1-nél és a *cisz*-EM2-nél tapasztalható eloszlások ugyancsak különböznek egymástól, és míg az EM1 esetén a preferált geometriák a *fully stacking* (*ff*) és az *ot*, addig az EM2 esetében leginkább az *edge-to-face* (*fe*, *ef*) orientációk jelennek meg.

18. táblázat A *cisz*- és *transz*-EM2 Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>3</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>4</sup> és Phe<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönható aromás párpainak különböző geometriai orientációi a 18. ábra szerinti táblázatba rendezve.

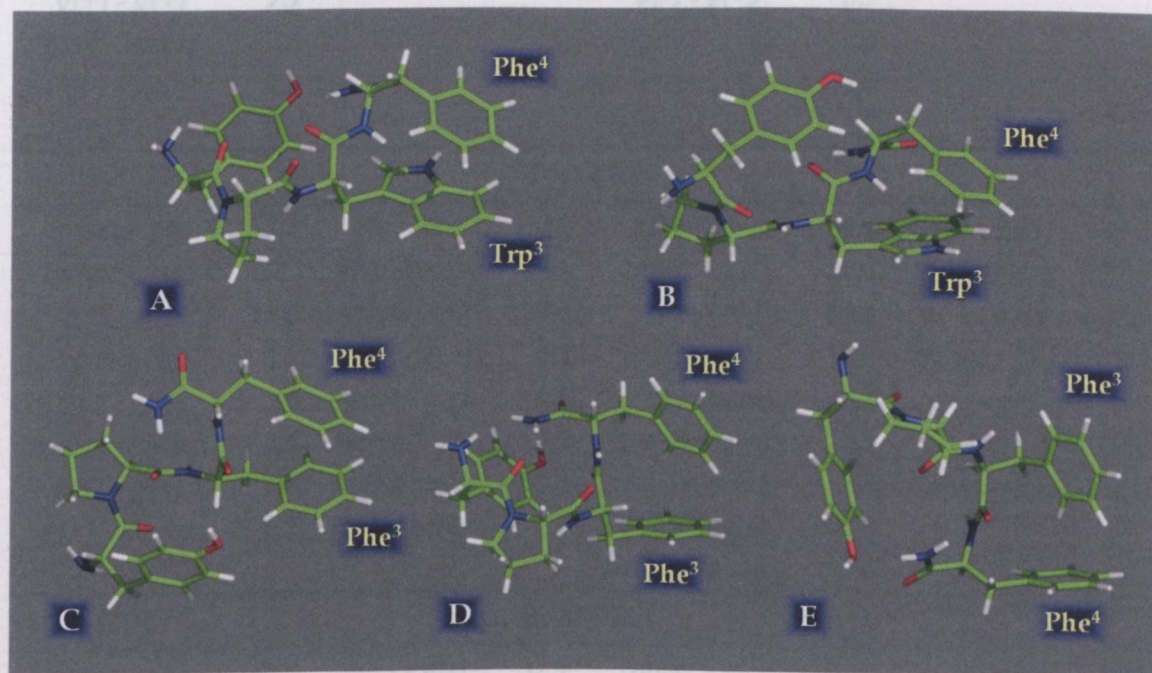
<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N- EM2	<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N- EM2	<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> - EM2	<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> - EM2																																				
Tyr <sup>1</sup> -Phe <sup>3</sup>																																							
<table><tr><td>4</td><td>12</td><td>47</td></tr><tr><td>27</td><td>37</td><td>26</td></tr><tr><td>16</td><td>134</td><td>3</td></tr></table>	4	12	47	27	37	26	16	134	3	<table><tr><td>1</td><td>1</td><td>23</td></tr><tr><td>70</td><td>-</td><td>-</td></tr><tr><td>11</td><td>-</td><td>-</td></tr></table>	1	1	23	70	-	-	11	-	-	<table><tr><td>10</td><td>17</td><td>71</td></tr><tr><td>102</td><td>24</td><td>47</td></tr><tr><td>3</td><td>76</td><td>6</td></tr></table>	10	17	71	102	24	47	3	76	6	<table><tr><td>-</td><td>2</td><td>22</td></tr><tr><td>94</td><td>-</td><td>-</td></tr><tr><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr></table>	-	2	22	94	-	-	-	-	-
4	12	47																																					
27	37	26																																					
16	134	3																																					
1	1	23																																					
70	-	-																																					
11	-	-																																					
10	17	71																																					
102	24	47																																					
3	76	6																																					
-	2	22																																					
94	-	-																																					
-	-	-																																					
Tyr <sup>1</sup> -Phe <sup>4</sup>																																							
<table><tr><td>7</td><td>27</td><td>38</td></tr><tr><td>16</td><td>14</td><td>31</td></tr><tr><td>16</td><td>15</td><td>1</td></tr></table>	7	27	38	16	14	31	16	15	1	<table><tr><td>18</td><td>12</td><td>4</td></tr><tr><td>50</td><td>20</td><td>2</td></tr><tr><td>6</td><td>19</td><td>-</td></tr></table>	18	12	4	50	20	2	6	19	-	<table><tr><td>3</td><td>19</td><td>36</td></tr><tr><td>21</td><td>16</td><td>21</td></tr><tr><td>12</td><td>27</td><td>2</td></tr></table>	3	19	36	21	16	21	12	27	2	<table><tr><td>9</td><td>3</td><td>6</td></tr><tr><td>10</td><td>-</td><td>1</td></tr><tr><td>4</td><td>18</td><td>-</td></tr></table>	9	3	6	10	-	1	4	18	-
7	27	38																																					
16	14	31																																					
16	15	1																																					
18	12	4																																					
50	20	2																																					
6	19	-																																					
3	19	36																																					
21	16	21																																					
12	27	2																																					
9	3	6																																					
10	-	1																																					
4	18	-																																					
Phe <sup>3</sup> -Phe <sup>4</sup>																																							
<table><tr><td>66</td><td>4</td><td>56</td></tr><tr><td>36</td><td>31</td><td>10</td></tr><tr><td>51</td><td>24</td><td>-</td></tr></table>	66	4	56	36	31	10	51	24	-	<table><tr><td>31</td><td>2</td><td>38</td></tr><tr><td>13</td><td>12</td><td>13</td></tr><tr><td>11</td><td>14</td><td>-</td></tr></table>	31	2	38	13	12	13	11	14	-	<table><tr><td>61</td><td>2</td><td>73</td></tr><tr><td>27</td><td>23</td><td>9</td></tr><tr><td>54</td><td>14</td><td>-</td></tr></table>	61	2	73	27	23	9	54	14	-	<table><tr><td>14</td><td>9</td><td>14</td></tr><tr><td>2</td><td>3</td><td>3</td></tr><tr><td>1</td><td>13</td><td>-</td></tr></table>	14	9	14	2	3	3	1	13	-
66	4	56																																					
36	31	10																																					
51	24	-																																					
31	2	38																																					
13	12	13																																					
11	14	-																																					
61	2	73																																					
27	23	9																																					
54	14	-																																					
14	9	14																																					
2	3	3																																					
1	13	-																																					

Az endomorfínok mindkét izomere esetén megfigyelhetők olyan konformerek, amelyek két kölcsönható aromás párt tartalmaznak egyidejűleg [IV]. A *transz*-EMk-nál az aromás-aromás kölcsönhatások különböző kombinációinak a száma magasabb, mint a *cisz*-EMk esetében. A *transz*-EMk esetén a két kölcsönható aromás párt tartalmazó konformerek aránya 10-14 %, míg a *cisz*-EMk-nál a konformerek 2-4 %-ában található két aromás-aromás kölcsönhatás. A két kölcsönható aromás párt tartalmazó konformerekben az aromás aminosavak oldalláncainak különféle térbeli elrendeződései figyelhetők meg a különböző geometriai orientációknak és rotamer kombinációknak megfelelően. Azon konformerek száma azonban, amelyekben mindhárom aromás aminosav egyidőben vesz részt az aromás-aromás kölcsönhatások kialakításában, nagyon kevés.





19. ábra A Tyr<sup>1</sup>-Trp<sup>3</sup> és Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>3</sup> kölcsönhatások preferált geometriai orientációi. A Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>3</sup> kölcsönhatások *of* (A), *ft* (B), *ot* (C), *et* (D) és *ef* (E) geometriái a *transz*-H<sub>2</sub>N-EM2-ben, valamint a Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>3</sup> kölcsönhatások *ft* (F) geometriája a *cisz*-H<sub>2</sub>N-EM2-ben.



20. ábra A Trp<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> és Phe<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönhatások preferált geometriai orientációi. A Trp<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönhatások *ff* (A) és *ot* (B) geometriái a *transz*-H<sub>2</sub>N-EM1-ben, valamint a Phe<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönhatások *ff* (C), *fe* (D) és *ef* (E) geometriái a *transz*-H<sub>2</sub>N-EM2-ben.



3.6.3. Oldallánc rotamer kombinációk

A *cisz*- és *transz*-EMk esetén megvizsgáltuk, hogy a Tyr<sup>1</sup>, Trp<sup>3</sup>/Phe<sup>3</sup> és Phe<sup>4</sup> aminosavak oldalláncai milyen rotamer állapottal jellemezhetők a különböző aromás-aromás kölcsönhatásokban, és ennek megfelelően meghatároztuk a kölcsönható aromás párokra karakterisztikus rotamer kombinációkat (19. és 20. táblázat) [IV], amelyekben az első rotamer a referencia gyűrűt tartalmazó aminosav oldalláncára vonatkozik, míg a második rotamer a kölcsönhatásban résztvevő másik aromás gyűrűt tartalmazó aminosav oldalláncára utal.

19. táblázat A *cisz*- és *transz*-EM2 Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>3</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>4</sup> és Phe<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönható aromás pájrai esetén előforduló rotamer kombinációk %-os arányai.

<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N-EM2		<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N-EM2		<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM2		<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM2	
Tyr <sup>1</sup> -Phe <sup>3</sup>							
<i>transz</i> - g(-)	31,4	g(-) - g(-)	75,5	g(+) - g(-)	27,8	g(-) - g(-)	78,0
<i>transz</i> - <i>transz</i>	21,6	<i>transz</i> - g(-)	21,7	<i>transz</i> - g(-)	26,4	<i>transz</i> - g(-)	20,3
<i>transz</i> - g(+)	18,6	g(+) - g(+)	1,9	g(+) - g(+)	14,3	g(+) - g(+)	1,7
g(-) - g(+)	16,7	g(-) - g(+)	0,9	g(+) - <i>transz</i>	10,1		
g(+) - g(+)	7,7			g(-) - g(+)	8,7		
g(+) - <i>transz</i>	2,3			<i>transz</i> - g(+)	6,5		
g(-) - g(-)	1,0			g(-) - g(-)	4,5		
g(+) - g(-)	0,7			<i>transz</i> - <i>transz</i>	1,7		
Tyr <sup>1</sup> -Phe <sup>4</sup>							
<i>transz</i> - g(-)	52,1	g(-) - g(-)	40,5	g(+) - g(-)	34,4	g(-) - g(-)	33,2
<i>transz</i> - g(+)	18,2	g(-) - <i>transz</i>	22,1	<i>transz</i> - g(-)	30,6	g(-) - <i>transz</i>	27,5
g(+) - g(-)	17,6	g(-) - g(+)	18,3	g(+) - g(+)	13,4	g(-) - g(+)	25,5
g(-) - g(+)	4,2	g(+) - g(+)	6,1	g(-) - g(-)	6,4	<i>transz</i> - g(-)	5,9
g(-) - g(-)	3,0	g(+) - g(-)	3,8	g(+) - <i>transz</i>	5,7	g(+) - g(+)	3,9
<i>transz</i> - <i>transz</i>	2,4	<i>transz</i> - g(-)	3,8	<i>transz</i> - g(+)	4,5	g(+) - g(-)	2,0
g(+) - g(+)	1,8	<i>transz</i> - g(+)	3,1	g(-) - g(+)	3,8	<i>transz</i> - g(+)	2,0
g(+) - <i>transz</i>	0,7	g(+) - <i>transz</i>	2,3	g(-) - <i>transz</i>	0,6		
				<i>transz</i> - <i>transz</i>	0,6		
Phe <sup>3</sup> -Phe <sup>4</sup>							
<i>transz</i> - g(-)	38,8	g(+) - g(-)	32,1	<i>transz</i> - g(-)	49,8	g(+) - g(+)	44,1
<i>transz</i> - g(+)	21,9	g(+) - g(+)	32,1	g(+) - g(+)	20,9	g(+) - g(-)	35,5
g(+) - g(+)	19,8	<i>transz</i> - g(-)	28,4	g(+) - g(-)	17,9	<i>transz</i> - g(-)	11,9
g(+) - g(-)	19,5	<i>transz</i> - g(+)	7,4	<i>transz</i> - g(+)	11,4	<i>transz</i> - g(+)	8,5

**20. táblázat** A *cisz-* és *transz*-EM1 Tyr<sup>1</sup>-Trp(5)<sup>3</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Trp(6)<sup>3</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>4</sup>, Trp(5)<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> és Trp(6)<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönható aromás párijai esetén előforduló rotamer kombinációk %-os arányai.

<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N-EM1		<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N-EM1		<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM1		<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM1	
Tyr <sup>1</sup> -Trp(5) <sup>3</sup>							
<i>transz</i> - g(-)	70,7	g(-) - g(-)	54,3	g(+) - g(+)	35,9	g(-) - g(-)	63,9
<i>transz</i> - <i>transz</i>	14,1	<i>transz</i> - g(-)	27,1	g(-) - g(+)	19,4	g(+) - g(+)	19,0
<i>transz</i> - g(+)	5,6	g(+) - g(+)	18,6	g(+) - <i>transz</i>	15,3	<i>transz</i> - g(-)	13,3
g(-) - g(-)	3,8			<i>transz</i> - <i>transz</i>	9,3	g(-) - g(+)	3,8
g(+) - g(+)	2,3			g(-) - g(-)	6,9		
g(+) - g(-)	1,5			g(+) - g(-)	6,4		
g(+) - <i>transz</i>	1,3			<i>transz</i> - g(-)	4,8		
g(-) - g(+)	0,7			<i>transz</i> - g(+)	2,0		
Tyr <sup>1</sup> -Trp(6) <sup>3</sup>							
<i>transz</i> - g(-)	66,4	g(-) - g(-)	39,4	g(+) - g(+)	40,0	g(-) - g(-)	59,0
<i>transz</i> - <i>transz</i>	13,2	<i>transz</i> - g(-)	36,4	g(-) - g(+)	22,2	g(+) - g(+)	20,8
<i>transz</i> - g(+)	6,3	g(+) - g(+)	21,2	g(+) - <i>transz</i>	8,9	<i>transz</i> - g(-)	14,8
g(-) - g(-)	4,7	g(-) - <i>transz</i>	2,0	<i>transz</i> - <i>transz</i>	8,0	g(-) - g(+)	3,8
g(+) - g(+)	3,0	<i>transz</i> - g(+)	1,0	g(-) - g(-)	7,6	g(+) - g(-)	1,6
g(+) - g(-)	2,7			g(+) - g(-)	5,8		
g(-) - g(+)	2,0			<i>transz</i> - g(-)	4,4		
g(+) - <i>transz</i>	1,7			<i>transz</i> - g(+)	3,1		
Tyr <sup>1</sup> -Phe <sup>4</sup>							
<i>transz</i> - g(-)	68,5	g(-) - g(-)	51,3	g(+) - g(-)	60,0	g(-) - g(-)	33,2
g(+) - g(-)	8,8	<i>transz</i> - g(-)	13,7	<i>transz</i> - g(-)	25,9	g(+) - g(-)	16,7
<i>transz</i> - g(+)	8,8	g(-) - g(+)	12,5	<i>transz</i> - g(+)	4,5	g(+) - g(+)	13,3
g(-) - g(-)	5,0	g(-) - <i>transz</i>	11,2	g(+) - g(+)	3,0	g(-) - g(+)	11,7
<i>transz</i> - <i>transz</i>	3,9	<i>transz</i> - g(+)	5,0	g(-) - g(-)	2,2	g(-) - <i>transz</i>	11,7
g(-) - g(+)	3,3	g(+) - g(+)	3,8	g(-) - g(+)	2,2	<i>transz</i> - g(-)	10,0
g(+) - <i>transz</i>	1,1	g(+) - g(-)	2,5	g(+) - <i>transz</i>	2,2	g(+) - <i>transz</i>	1,7
g(+) - g(+)	0,6					<i>transz</i> - g(+)	1,7
Trp(5) <sup>3</sup> -Phe <sup>4</sup>							
<i>transz</i> - g(-)	79,7	<i>transz</i> - g(-)	46,4	<i>transz</i> - g(-)	47,8	g(+) - g(-)	48,4
g(+) - g(-)	12,5	g(+) - g(-)	28,1	<i>transz</i> - g(+)	33,7	<i>transz</i> - g(+)	25,2
<i>transz</i> - g(+)	5,5	g(+) - g(+)	21,0	g(+) - g(-)	18,2	g(+) - g(+)	22,0
g(+) - g(+)	2,3	<i>transz</i> - g(+)	4,5	g(+) - g(+)	0,3	<i>transz</i> - g(-)	4,4
Trp(6) <sup>3</sup> -Phe <sup>4</sup>							
<i>transz</i> - g(-)	80,7	<i>transz</i> - g(-)	47,1	<i>transz</i> - g(-)	52,0	g(+) - g(-)	44,0
g(+) - g(-)	8,8	g(+) - g(-)	28,0	<i>transz</i> - g(+)	35,8	<i>transz</i> - g(+)	30,7
<i>transz</i> - g(+)	7,0	g(+) - g(+)	17,6	g(+) - g(-)	12,2	g(+) - g(+)	17,3
g(+) - g(+)	3,5	<i>transz</i> - g(+)	7,3			<i>transz</i> - g(-)	8,0

A *transz*-EM1-nél a Tyr<sup>1</sup>-Trp(5)<sup>3</sup> és Tyr<sup>1</sup>-Trp(6)<sup>3</sup> kölcsönható párok esetén, valamint a *transz*-EM2-nél a Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>3</sup> kölcsönhatások esetében, illetve az EM1 és EM2 tetrapeptideknél a Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönhatások esetén több különböző rotamer kombináció figyelhető meg, mint a *cisz*-EM1-nél a Tyr<sup>1</sup>-Trp(5)<sup>3</sup> és Tyr<sup>1</sup>-Trp(6)<sup>3</sup> kölcsönható párok esetében, a *cisz*-EM2-nél a Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>3</sup> kölcsönhatások esetén, valamint az EM1 molekuláknál a Trp(5)<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> és Trp(6)<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönható párok esetében, illetve az EM2 peptideknél a Phe<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönhatások esetén. Az utóbbi két esetben csak négy rotamer kombináció fordul elő, amelyek közül az egyik hiányzik a *transz*-H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>-EM1-nél a Trp(6)<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönhatások esetében: *g*(+)-*g*(-), *g*(+)-*g*(+), *transz*-*g*(-) és *transz*-*g*(+).

A többféle lehetséges rotamer pár ellenére az aromás-aromás kölcsönhatások minden egyes típusánál megfigyelhető egy, két vagy néhány nagy populációjú rotamer kombináció. Így amennyiben a kölcsönható aromás párok esetében kiválasztjuk a leginkább preferált rotamer kombinációkat, akkor az alábbi megfigyeléseket tehetjük. A *transz*-H<sub>2</sub>N-EMk-nál az aromás-aromás kölcsönhatások összes típusa esetén leggyakrabban a *transz*-*g*(-) rotamer pár fordul elő. A *transz*-H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>-EMk-nál a Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönhatások esetében a legnagyobb populációval rendelkező rotamer kombináció a *g*(+)-*g*(-), míg a Trp<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> és Phe<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönható párok esetén a *transz*-*g*(-). A *cisz*-EMk-nál a Tyr<sup>1</sup>-Trp<sup>3</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>3</sup> és Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönhatások esetében főként a *g*(-)-*g*(-) rotamer kombinációk preferáltak.

### 3.6.4. Aromás-aromás kölcsönhatások a másodlagos szerkezetekben

Mindkét tetrapeptid esetén megvizsgáltuk, hogy a *cisz* és *transz* izomerek konformereiben kialakuló különböző típusú β- és γ-turn másodlagos szerkezeti elemekben milyen aromás-aromás kölcsönhatások jelennek meg [IV].

A *transz*-EMk esetén a Tyr<sup>1</sup>-Trp<sup>3</sup> és Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>3</sup> kölcsönhatások jelentős számban találhatók meg a III típusú β-turn-ökben, míg az V típusú β-turn-ök főként Trp<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> és Phe<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönható párokat tartalmaznak, ugyanakkor ezekben a turn struktúrákban a Tyr<sup>1</sup>-Trp<sup>3</sup> és Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>3</sup> kölcsönhatások teljesen hiányoznak. Az N-terminális inverz γ-turn-nel jellemezhető konformerek esetén az aromás-aromás kölcsönhatások majd minden típusa megfigyelhető, ennek ellenére ezekben a struktúrákban főként Tyr<sup>1</sup>-Trp<sup>3</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>3</sup>, Trp<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> és Phe<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönható párok alakulnak ki. A C-terminális γ-turn-t tartalmazó konformerek esetében a Tyr<sup>1</sup>-Trp<sup>3</sup> kölcsönhatások figyelhetők meg jelentős mennyiségben a *transz*-H<sub>2</sub>N-EM1-nél, míg főként a Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>4</sup> és Phe<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönható párok jelennek meg a *transz*-H<sub>2</sub>N-EM2-nél, ugyanakkor a Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>3</sup> és Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönhatások alakulnak ki leginkább a *transz*-H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>-EM2-nél. A C-terminális inverz γ-turn-nel karakteri-



zálható konformerek esetén főként a Tyr<sup>1</sup>-Trp<sup>3</sup> és Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>3</sup> kölcsönható párok figyelhetők meg.

A *cisz*-H<sub>2</sub>N-EMk esetében a Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>4</sup>, Trp(5)<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> és Phe<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönhatások találhatók meg jelentős mennyiségben a III típusú β-turn-ökben, míg a *cisz*-H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>-EMk esetén ezek a β-turn-ök főként Trp(5)<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> és Phe<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönható párokat tartalmaznak, mindemellett a *cisz*-EM2 tetrapeptideknél a Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>3</sup> kölcsönhatások nem jelennek meg a III típusú β-turn-ökben. A C-terminális γ-turn-nel jellemezhető konformerek esetén főként a Tyr<sup>1</sup>-Trp<sup>3</sup> és Trp(5)<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönható párok figyelhetők meg a *cisz*-H<sub>2</sub>N-EM1-nél, míg leginkább a Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>3</sup> kölcsönhatások alakulnak ki a *cisz*-EM2 peptideknél. A C-terminális inverz γ-turn-t tartalmazó konformerek esetében többnyire a Tyr<sup>1</sup>-Trp<sup>3</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>3</sup> és Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönható párok találhatók meg a *cisz*-H<sub>2</sub>N-EMk-nál, míg főként a Tyr<sup>1</sup>-Trp<sup>3</sup> és Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>3</sup> kölcsönhatások alakulnak ki a *cisz*-H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>-EMk-nál.

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a különböző típusú β- és γ-turn-ök többsége jellemezhető valamilyen aromás-aromás kölcsönhatással, ugyanakkor a *transz*-EMk esetén nagyobb arányban figyelhetők meg a kölcsönható aromás párok a kialakuló másodlagos szerkezeti elemekben, mint a *cisz*-EMk esetében.

### 3.7. Prolin-aromás kölcsönhatások

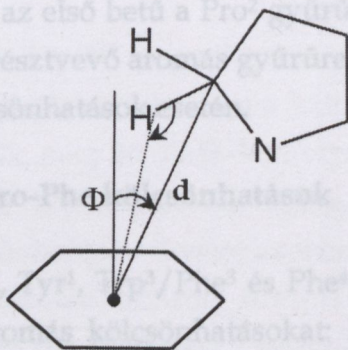
#### 3.7.1. Prolin-aromás kölcsönhatások meghatározása

Az endomorfinkban a kettes pozícióban egy Pro található, míg az egyes, hármas és négyes pozíciókban aromás aminosavak helyezkednek el (EM1: Tyr<sup>1</sup>, Trp<sup>3</sup>, Phe<sup>4</sup>; EM2: Tyr<sup>1</sup>, Phe<sup>3</sup>, Phe<sup>4</sup>). Ezen tetrapeptidek esetén a Pro és az aromás oldallánccal rendelkező aminosavak között kialakuló prolin-aromás kölcsönhatások hozzájárulhatnak az endomorfink különböző konformereinek stabilizálásához.

A prolin-aromás kölcsönhatások vizsgálata során meghatároztuk a Pro pirrolidin gyűrűjének, valamint az aromás aminosavak oldallánc gyűrűinek centroidjait. A Pro esetén az öttagú gyűrű geometriai középpontja határozta meg a centroidot, míg az aromás gyűrűk centroidjait az aromás-aromás kölcsönhatások vizsgálatánál már leírt módon definiáltuk.

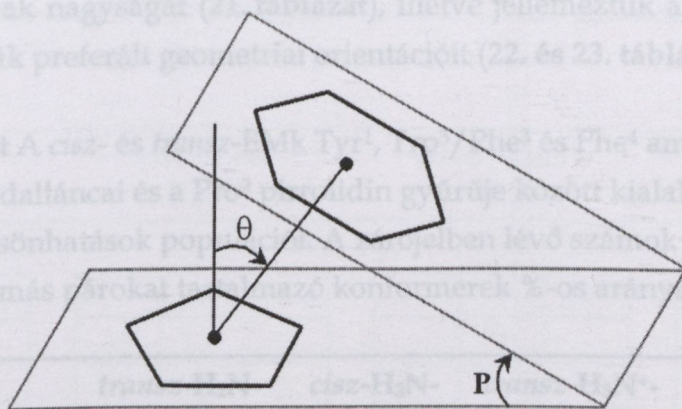
A prolin-aromás kölcsönhatások azonosításához először megmértük a Pro<sup>2</sup> gyűrűjének C atomjai és az aromás gyűrűk centroidjai közötti távolságokat (*d*) (21. ábra). Ezt követően két paramétert számítottunk ki, amelyek egyike a Pro szénatomját az aromás gyűrű centroidjával összekötő egyenes és az aromás gyűrű centroidján átmenő, az öt- vagy hattagú gyűrű síkjára állított normális által bezárt szög (*Φ*) (21. ábra). A másik paraméter pedig a CH<sup>1</sup>...centroid szög, amelyet a CH

kötés és a H atomot az aromás gyűrű centroidjával összekötő egyenes határoz meg (21. ábra). A fent említett távolság és szög értékek alapján azokat a kölcsönhatásokat tekintettük prolin-aromás kölcsönhatásnak, amelyek esetén a Pro gyűrűjének bármely C atomja és az aromás gyűrű centroidja között mért távolság kisebb volt 4,5 Å-nél [91], továbbá a  $\Phi$  szög kisebb volt 30°-nál [92], valamint a  $CH\cdots centroid$  szög nagyobb volt 120°-nál [92].



### 3.7.2. Pro-Tyr, Pro-Trp és Pro-Phe kölcsönhatások

Az endomorfinek Pro<sup>2</sup>-Tyr<sup>1</sup>, Pro<sup>2</sup>-Trp<sup>5</sup> és Phe<sup>4</sup> aminosavai esetén megvizsgáltuk a kialakuló prolin-aromás kölcsönhatásokat: Pro<sup>2</sup>-Tyr<sup>1</sup>, Pro<sup>2</sup>-Trp<sup>5</sup>, Trp<sup>6</sup>, Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>4</sup> és Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>4</sup> (a Trp<sup>5</sup> a triptofán indol oldalláncának öttagú gyűrűje). A kölcsönhatások meghatározásához a 21. ábrán látható paramétereket (d,  $\Phi$  és C-H $\cdots centroid$ ) alkalmaztuk.



22. ábra A kölcsönható Pro és aromás gyűrűk egymáshoz viszonyított geometriai orientációjának azonosításához alkalmazott paraméterek ( $P$  és  $\theta$ ).

A kölcsönható Pro és aromás gyűrűk egymáshoz viszonyított geometriai orientációjának karakterizálásához ugyanazt a két paramétert ( $P$  és  $\theta$ ) [92] számítottuk ki (22. ábra), mint az aromás-aromás kölcsönhatások vizsgálatánál [88,89]. A Pro esetén az öttagú pirrolidin gyűrű alapján, míg az aromás aminosavak esetében az oldalláncok öt-, illetve hattagú gyűrűi alapján határoztuk meg a síkokat. A prolin-aromás kölcsönhatások tekintetében referencia gyűrűként minden esetben a Pro pirrolidin gyűrűje szerepelt, így a  $\theta$  egy olyan szöggént definiálható, amelyet a



Pro és az aromás gyűrűk centroidjait összekötő egyenes, valamint a pirrolidin gyűrű centroidján átmenő, az öttagú gyűrű síkjára állított normális határoz meg.

A  $P$  és  $\theta$  paraméterek alapján - az aromás-aromás kölcsönhatásokhoz hasonlóan - jellemezhető a prolin-aromás kölcsönhatásban résztvevő pirrolidin és aromás gyűrűk relatív térbeli elrendeződése [89,92], és ezen két szög különféle kombinációinak megfelelően a kölcsönható Pro és aromás gyűrűk geometriai orientációja szintén kilenc típusba sorolható: *ff*, *of*, *ee*, *ft*, *ot*, *et*, *fe*, *oe* és *ef* geometriák (18. ábra). Ebben az esetben az első betű a Pro<sup>2</sup> gyűrűjére vonatkozik, míg a második betű a kölcsönhatásban résztvevő aromás gyűrűre, és a betűk ugyanazt jelentik, mint az aromás-aromás kölcsönhatások esetén.

### 3.7.2. Pro-Tyr, Pro-Trp és Pro-Phe kölcsönhatások

Az endomorfinek Pro<sup>2</sup>, Tyr<sup>1</sup>, Trp<sup>3</sup>/Phe<sup>3</sup> és Phe<sup>4</sup> aminosavai esetén megvizsgáltuk a kialakuló prolin-aromás kölcsönhatásokat: Pro<sup>2</sup>-Tyr<sup>1</sup>, Pro<sup>2</sup>-Trp(5)<sup>3</sup>, Pro<sup>2</sup>-Trp(6)<sup>3</sup>, Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup> és Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>4</sup> (a Trp(5) a triptofán indol oldalláncának öttagú gyűrűjét, míg a Trp(6) az oldallánc hattagú gyűrűjét jelöli). A Pro<sup>2</sup> és aromás aminosav párok esetén azonosítottuk, hogy a Pro<sup>2</sup> melyik C atomjai vesznek részt a CH $\cdots$  $\pi$  kölcsönhatásokban, valamint meghatároztuk a prolin-aromás kölcsönhatások populációinak nagyságát (21. táblázat), illetve jellemeztük a kölcsönható Pro<sup>2</sup> és aromás gyűrűk preferált geometriai orientációit (22. és 23. táblázat) [IV].

**21. táblázat** A *cisz*- és *transz*-EMk Tyr<sup>1</sup>, Trp<sup>3</sup>/Phe<sup>3</sup> és Phe<sup>4</sup> aminosavainak aromás oldalláncai és a Pro<sup>2</sup> pirrolidin gyűrűje között kialakuló prolin-aromás kölcsönhatások populációi. A zárójelben lévő számok a kölcsönható prolin-aromás párokat tartalmazó konformerek %-os arányait mutatják.

	<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N- EM1	<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N- EM1	<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> - EM1	<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> - EM1
Pro <sup>2</sup> -Tyr <sup>1</sup>	139 (14)	267 (52)	96 (13)	181 (33)
Pro <sup>2</sup> -Trp(5) <sup>3</sup>	123 (12)	55 (11)	13 (2)	35 (6)
Pro <sup>2</sup> -Trp(6) <sup>3</sup>	191 (19)	107 (21)	35 (5)	85 (16)
Pro <sup>2</sup> -Phe <sup>4</sup>	121 (12)	77 (15)	19 (3)	75 (14)
	<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N- EM2	<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N- EM2	<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> - EM2	<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> - EM2
Pro <sup>2</sup> -Tyr <sup>1</sup>	146 (15)	293 (38)	181 (18)	252 (48)
Pro <sup>2</sup> -Phe <sup>3</sup>	86 (9)	152 (20)	98 (10)	67 (13)
Pro <sup>2</sup> -Phe <sup>4</sup>	80 (8)	101 (13)	117 (12)	99 (19)



A *cisz*-EMk esetén nagyobb arányban fordulnak elő a Pro<sup>2</sup>-Tyr<sup>1</sup> kölcsönhatások, mint a *transz*-EMk-nál, ugyanakkor az EM2 peptideknél a Pro<sup>2</sup>-Tyr<sup>1</sup> kölcsönhatások populációja nagyobb a Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup> és Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönható párok populációival összehasonlítva. A *transz*-H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>-EM1 és *cisz*-EM1 esetében a különböző prolin-aromás kölcsönhatások hasonló arányai figyelhetők meg, azonban a *transz*-H<sub>2</sub>N-EM1-nél a Pro<sup>2</sup>-Trp(6)<sup>3</sup> kölcsönható párok száma nagyobb, míg a Pro<sup>2</sup>-Trp(5)<sup>3</sup> és Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönhatások száma kisebb a Pro<sup>2</sup>-Tyr<sup>1</sup> kölcsönható párok számánál.

Attól függően, hogy a Trp(5)<sup>3</sup> vagy Trp(6)<sup>3</sup> gyűrűt alkalmaztuk a prolin-aromás kölcsönhatások meghatározásakor, ezen kölcsönható prolin-aromás párok különböző arányai találhatók meg az EM1 konformereiben, és mindkét izomer esetén nagyobb a Pro<sup>2</sup>-Trp(6)<sup>3</sup> kölcsönhatások száma, mint a Pro<sup>2</sup>-Trp(5)<sup>3</sup> kölcsönható párok száma. Ezen különbségek ellenére azonban ebben az esetben is megfigyelhetők átfedések a kölcsönhatások között. A Pro<sup>2</sup>-Trp(5)<sup>3</sup> kölcsönható párok 74-89 %-ában a Trp(6)<sup>3</sup> gyűrű szintén részt vesz a prolin-aromás kölcsönhatás kialakításában, míg a Pro<sup>2</sup>-Trp(6)<sup>3</sup> kölcsönható párok 29-47 %-a esetén a Trp(5)<sup>3</sup> gyűrű ugyancsak megfigyelhető a prolin-aromás kölcsönhatásban.

**22. táblázat** A *cisz*- és *transz*-EM1 Pro<sup>2</sup>-Tyr<sup>1</sup>, Pro<sup>2</sup>-Trp(5)<sup>3</sup>, Pro<sup>2</sup>-Trp(6)<sup>3</sup> és Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönható prolin-aromás párjainak különböző geometriai orientációi a 18. ábra szerinti táblázatba rendezve.

<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N-EM1	<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N-EM1	<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM1	<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -EM1																																				
Pro <sup>2</sup> -Tyr <sup>1</sup>																																							
<table><tr><td>-</td><td>18</td><td>-</td></tr><tr><td>-</td><td>121</td><td>-</td></tr><tr><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr></table>	-	18	-	-	121	-	-	-	-	<table><tr><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr><tr><td>13</td><td>168</td><td>-</td></tr><tr><td>82</td><td>4</td><td>-</td></tr></table>	-	-	-	13	168	-	82	4	-	<table><tr><td>-</td><td>8</td><td>-</td></tr><tr><td>-</td><td>88</td><td>-</td></tr><tr><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr></table>	-	8	-	-	88	-	-	-	-	<table><tr><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr><tr><td>2</td><td>145</td><td>-</td></tr><tr><td>33</td><td>1</td><td>-</td></tr></table>	-	-	-	2	145	-	33	1	-
-	18	-																																					
-	121	-																																					
-	-	-																																					
-	-	-																																					
13	168	-																																					
82	4	-																																					
-	8	-																																					
-	88	-																																					
-	-	-																																					
-	-	-																																					
2	145	-																																					
33	1	-																																					
Pro <sup>2</sup> -Trp(5) <sup>3</sup>																																							
<table><tr><td>-</td><td>-</td><td>1</td></tr><tr><td>21</td><td>21</td><td>-</td></tr><tr><td>47</td><td>33</td><td>-</td></tr></table>	-	-	1	21	21	-	47	33	-	<table><tr><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr><tr><td>18</td><td>11</td><td>-</td></tr><tr><td>4</td><td>22</td><td>-</td></tr></table>	-	-	-	18	11	-	4	22	-	<table><tr><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr><tr><td>-</td><td>4</td><td>-</td></tr><tr><td>3</td><td>6</td><td>-</td></tr></table>	-	-	-	-	4	-	3	6	-	<table><tr><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr><tr><td>-</td><td>4</td><td>-</td></tr><tr><td>19</td><td>12</td><td>-</td></tr></table>	-	-	-	-	4	-	19	12	-
-	-	1																																					
21	21	-																																					
47	33	-																																					
-	-	-																																					
18	11	-																																					
4	22	-																																					
-	-	-																																					
-	4	-																																					
3	6	-																																					
-	-	-																																					
-	4	-																																					
19	12	-																																					
Pro <sup>2</sup> -Trp(6) <sup>3</sup>																																							
<table><tr><td>-</td><td>-</td><td>2</td></tr><tr><td>16</td><td>60</td><td>8</td></tr><tr><td>45</td><td>60</td><td>-</td></tr></table>	-	-	2	16	60	8	45	60	-	<table><tr><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr><tr><td>1</td><td>48</td><td>4</td></tr><tr><td>15</td><td>39</td><td>-</td></tr></table>	-	-	-	1	48	4	15	39	-	<table><tr><td>-</td><td>-</td><td>4</td></tr><tr><td>-</td><td>14</td><td>-</td></tr><tr><td>6</td><td>11</td><td>-</td></tr></table>	-	-	4	-	14	-	6	11	-	<table><tr><td>-</td><td>-</td><td>1</td></tr><tr><td>-</td><td>31</td><td>1</td></tr><tr><td>12</td><td>40</td><td>-</td></tr></table>	-	-	1	-	31	1	12	40	-
-	-	2																																					
16	60	8																																					
45	60	-																																					
-	-	-																																					
1	48	4																																					
15	39	-																																					
-	-	4																																					
-	14	-																																					
6	11	-																																					
-	-	1																																					
-	31	1																																					
12	40	-																																					
Pro <sup>2</sup> -Phe <sup>4</sup>																																							
<table><tr><td>-</td><td>14</td><td>40</td></tr><tr><td>19</td><td>42</td><td>3</td></tr><tr><td>2</td><td>1</td><td>-</td></tr></table>	-	14	40	19	42	3	2	1	-	<table><tr><td>-</td><td>5</td><td>29</td></tr><tr><td>10</td><td>11</td><td>3</td></tr><tr><td>18</td><td>1</td><td>-</td></tr></table>	-	5	29	10	11	3	18	1	-	<table><tr><td>-</td><td>2</td><td>9</td></tr><tr><td>-</td><td>6</td><td>2</td></tr><tr><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr></table>	-	2	9	-	6	2	-	-	-	<table><tr><td>-</td><td>1</td><td>31</td></tr><tr><td>14</td><td>8</td><td>1</td></tr><tr><td>18</td><td>2</td><td>-</td></tr></table>	-	1	31	14	8	1	18	2	-
-	14	40																																					
19	42	3																																					
2	1	-																																					
-	5	29																																					
10	11	3																																					
18	1	-																																					
-	2	9																																					
-	6	2																																					
-	-	-																																					
-	1	31																																					
14	8	1																																					
18	2	-																																					

**23. táblázat** A *cisz*- és *transz*-EM2 Pro<sup>2</sup>-Tyr<sup>1</sup>, Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup> és Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönható prolin-aromás párjainak különböző geometriai orientációi a 18. ábra szerinti táblázatba rendezve.

<i>transz</i> -H <sub>2</sub> N- EM2	<i>cisz</i> -H <sub>2</sub> N- EM2	<i>transz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> - EM2	<i>cisz</i> -H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> - EM2																																				
Pro <sup>2</sup> -Tyr <sup>1</sup>																																							
<table><tr><td>-</td><td>16</td><td>-</td></tr><tr><td>-</td><td>129</td><td>-</td></tr><tr><td>-</td><td>1</td><td>-</td></tr></table>	-	16	-	-	129	-	-	1	-	<table><tr><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr><tr><td>6</td><td>234</td><td>-</td></tr><tr><td>50</td><td>3</td><td>-</td></tr></table>	-	-	-	6	234	-	50	3	-	<table><tr><td>-</td><td>18</td><td>-</td></tr><tr><td>-</td><td>163</td><td>-</td></tr><tr><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr></table>	-	18	-	-	163	-	-	-	-	<table><tr><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr><tr><td>19</td><td>167</td><td>-</td></tr><tr><td>65</td><td>1</td><td>-</td></tr></table>	-	-	-	19	167	-	65	1	-
-	16	-																																					
-	129	-																																					
-	1	-																																					
-	-	-																																					
6	234	-																																					
50	3	-																																					
-	18	-																																					
-	163	-																																					
-	-	-																																					
-	-	-																																					
19	167	-																																					
65	1	-																																					
Pro <sup>2</sup> -Phe <sup>3</sup>																																							
<table><tr><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr><tr><td>12</td><td>8</td><td>-</td></tr><tr><td>19</td><td>47</td><td>-</td></tr></table>	-	-	-	12	8	-	19	47	-	<table><tr><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr><tr><td>21</td><td>72</td><td>1</td></tr><tr><td>12</td><td>46</td><td>-</td></tr></table>	-	-	-	21	72	1	12	46	-	<table><tr><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr><tr><td>8</td><td>22</td><td>-</td></tr><tr><td>9</td><td>59</td><td>-</td></tr></table>	-	-	-	8	22	-	9	59	-	<table><tr><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr><tr><td>2</td><td>9</td><td>-</td></tr><tr><td>21</td><td>35</td><td>-</td></tr></table>	-	-	-	2	9	-	21	35	-
-	-	-																																					
12	8	-																																					
19	47	-																																					
-	-	-																																					
21	72	1																																					
12	46	-																																					
-	-	-																																					
8	22	-																																					
9	59	-																																					
-	-	-																																					
2	9	-																																					
21	35	-																																					
Pro <sup>2</sup> -Phe <sup>4</sup>																																							
<table><tr><td>-</td><td>6</td><td>20</td></tr><tr><td>6</td><td>16</td><td>20</td></tr><tr><td>7</td><td>5</td><td>-</td></tr></table>	-	6	20	6	16	20	7	5	-	<table><tr><td>-</td><td>12</td><td>44</td></tr><tr><td>16</td><td>20</td><td>2</td></tr><tr><td>4</td><td>3</td><td>-</td></tr></table>	-	12	44	16	20	2	4	3	-	<table><tr><td>-</td><td>11</td><td>39</td></tr><tr><td>3</td><td>36</td><td>18</td></tr><tr><td>7</td><td>3</td><td>-</td></tr></table>	-	11	39	3	36	18	7	3	-	<table><tr><td>-</td><td>4</td><td>58</td></tr><tr><td>9</td><td>10</td><td>1</td></tr><tr><td>17</td><td>-</td><td>-</td></tr></table>	-	4	58	9	10	1	17	-	-
-	6	20																																					
6	16	20																																					
7	5	-																																					
-	12	44																																					
16	20	2																																					
4	3	-																																					
-	11	39																																					
3	36	18																																					
7	3	-																																					
-	4	58																																					
9	10	1																																					
17	-	-																																					

A Pro<sup>2</sup>-Tyr<sup>1</sup> kölcsönhatások esetén a *transz*-EMk-nál csak a Pro<sup>2</sup> gyűrű C<sup>δ</sup> atomja vesz részt a CH<sup>⋯</sup>π kölcsönhatások kialakításában, míg a *cisz*-EMk-nál főként a pirrolidin gyűrű C<sup>α</sup> atomja szerepel a prolin-aromás kölcsönhatásokban, azonban kisebb számban a C<sup>β</sup> és C<sup>γ</sup> atomok is megfigyelhetők ezen kölcsönhatások esetén.

A Pro<sup>2</sup>-Trp(5)<sup>3</sup>, Pro<sup>2</sup>-Trp(6)<sup>3</sup> és Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup> kölcsönhatások esetében a *transz*-EMk-nál leginkább a Pro<sup>2</sup> gyűrű C<sup>β</sup> és C<sup>γ</sup> atomjai szerepelnek a CH<sup>⋯</sup>π kölcsönhatásokban, míg a *cisz*-EMk-nál főként a pirrolidin gyűrű C<sup>β</sup>, C<sup>γ</sup> és C<sup>δ</sup> atomjai vesznek részt a prolin-aromás kölcsönhatásokban.

A Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönhatások esetén a *transz*-EMk-nál túlnyomórészt a Pro<sup>2</sup> gyűrű C<sup>α</sup> és C<sup>β</sup> atomjai vesznek részt a CH<sup>⋯</sup>π kölcsönhatások kialakításában, míg a *cisz*-EMk-nál leginkább a pirrolidin gyűrű C<sup>β</sup> és C<sup>γ</sup> atomjai szerepelnek a prolin-aromás kölcsönhatásokban.

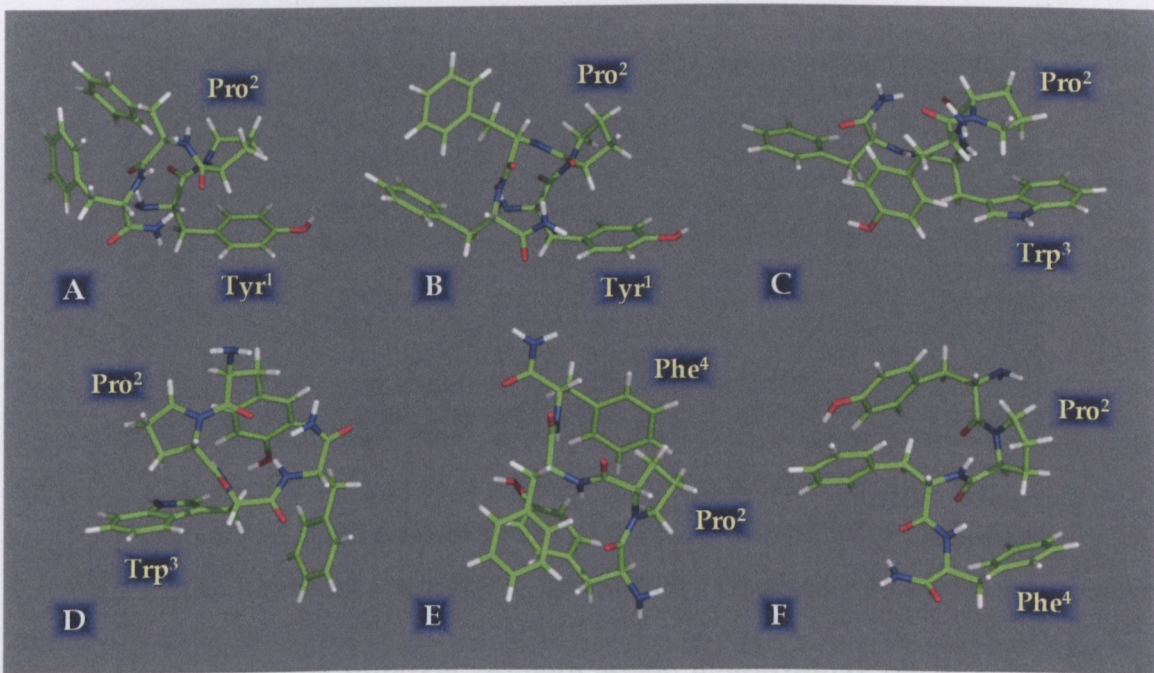
A *transz*-EMk-nál a Pro<sup>2</sup>-Tyr<sup>1</sup> kölcsönhatások esetén túlnyomórészt az *ot* orientáció alakul ki, míg a *cisz*-EMk-nál a preferált geometriák az *ff* és az *ot* (23. ábra). Bhattacharyya és Chakrabarti [92] azt tapasztalták, hogy a Pro gyűrű és az azt megelőző aromás gyűrű közötti kölcsönhatás esetében a preferált orientáció az *ot*.

Az EM1 peptideknél a Pro<sup>2</sup>-Trp(6)<sup>3</sup> kölcsönhatások esetén az *of* és az *ot* geometriák nagy populációi figyelhetők meg (23. ábra), míg az EM2 molekuláknál



a Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup> kölcsönható párok esetében főként az *of* orientáció alakul ki. Bhattacharya és Chakrabarti [92] a Pro gyűrű és az azt követő aromás gyűrű közötti kölcsönhatásra vonatkozóan azt állapították meg, hogy a preferált geometria az *of*.

A *transz*-EMk-nál a Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönhatások esetén főként az *ot* és az *ef* orientációk figyelhetők meg (23. ábra), míg a *cisz*-EMk-nál a preferált geometria az *ef*.



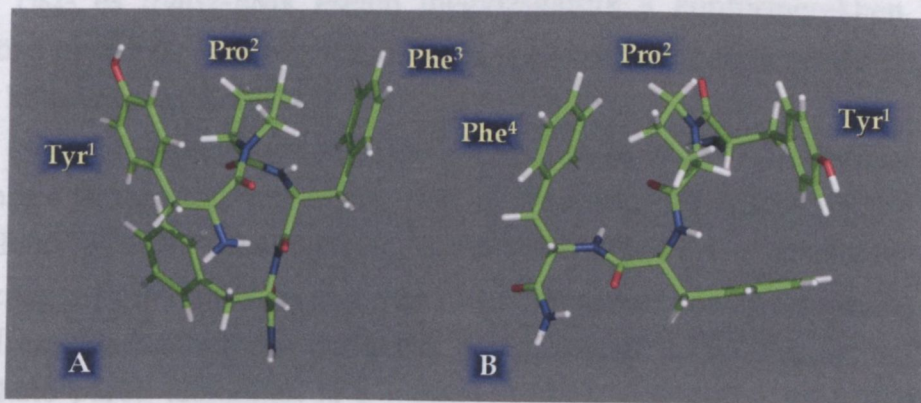
**23. ábra** A Pro<sup>2</sup>-Tyr<sup>1</sup>, Pro<sup>2</sup>-Trp<sup>3</sup>, Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup> és Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönhatások preferált geometriai orientációi. A Pro<sup>2</sup>-Tyr<sup>1</sup> kölcsönhatások *ff* (A) és *ot* (B) geometriái a *cisz*-H<sub>2</sub>N-EM2-ben, valamint a Pro<sup>2</sup>-Trp<sup>3</sup> kölcsönhatások *of* (C) és *ot* (D) geometriái a *transz*-H<sub>2</sub>N-EM1-ben, illetve a Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönhatások *ot* (E) és *ef* (F) geometriái a *transz*-H<sub>2</sub>N-EM2-ben.

A *cisz*- és *transz*-EMk esetén megfigyelhetők olyan konformerek, amelyekben a Pro<sup>2</sup> egyidejűleg két aromás aminosavval alakít ki kölcsönhatást [IV]. A *transz*-EMk-nál a prolin-aromás kölcsönhatások különböző kombinációi kisebb arányban fordulnak elő, mint a *cisz*-EMk esetén. A *transz*-EMk-nál a konformerek 2-4 %-ában található két kölcsönható prolin-aromás pár, míg a *cisz*-EMk esetében a két prolin-aromás kölcsönhatást tartalmazó konformerek aránya 10-20 %. A két kölcsönható prolin-aromás párral rendelkező konformerekben - a különböző geometriai orientációknak megfelelően - az aromás oldalláncok különböző térbeli elrendeződései figyelhetők meg.

A *cisz*-EM1-nél a Pro<sup>2</sup>-Tyr<sup>1</sup> és Pro<sup>2</sup>-Trp<sup>3</sup> kölcsönhatásokat, valamint a *cisz*-EM2-nél a Pro<sup>2</sup>-Tyr<sup>1</sup> és Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup> kölcsönható párokat tartalmazó konformerekben az esetek többségében megfigyelhető az ún. kompakt „szendvics” struktúra [25,26,29], amelyben a Tyr<sup>1</sup> és Trp<sup>3</sup> aminosavak oldalláncai két oldalról közrefogják



a Pro<sup>2</sup> gyűrűjét a *cisz*-EM1 esetén, valamint a Tyr<sup>1</sup> és Phe<sup>3</sup> aminosavak aromás gyűrűi a Pro<sup>2</sup> pirrolidin gyűrűjével alakítanak ki *stacking*-et a *cisz*-EM2 esetében (24. ábra) [IV]. A *cisz*-EMk-nál a Pro<sup>2</sup>-Tyr<sup>1</sup> és Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönható párokat tartalmazó konformerek esetén ez a kompakt „szendvics” struktúra, amelyet a Tyr<sup>1</sup>, Pro<sup>2</sup> és Phe<sup>4</sup> gyűrűk közötti *stacking* alakít ki (24. ábra) [IV], csak néhány esetben figyelhető meg.



24. ábra A Tyr<sup>1</sup>, Pro<sup>2</sup> és Phe<sup>3</sup> gyűrűk közötti *stacking* által (A), illetve a Tyr<sup>1</sup>, Pro<sup>2</sup> és Phe<sup>4</sup> gyűrűk közötti *stacking* által (B) kialakuló ún. kompakt „szendvics” struktúrák a *cisz*-H<sub>2</sub>N-EM2-ben.

Az endomorfínok mindkét izomere esetén előfordulnak olyan konformerek, amelyek két kölcsönható aromás párt vagy két prolin-aromás kölcsönhatást tartalmaznak egyidőben. Mindemellett azonban megfigyelhetők olyan struktúrák is, amelyek egyidejűleg egy aromás-aromás és egy prolin-aromás kölcsönhatással jellemezhetők [IV], és ebben az esetben az aromás aminosavak oldalláncainak különféle térbeli elrendeződései alakulnak ki az aromás-aromás és prolin-aromás kölcsönhatások geometriai orientációinak, valamint az aromás oldalláncok rotamer kombinációinak megfelelően.

### 3.7.3. Oldallánc rotamerek

A endomorfínok mindkét izomere esetén megvizsgáltuk a Tyr<sup>1</sup>, Trp<sup>3</sup>/Phe<sup>3</sup> és Phe<sup>4</sup> aminosavak oldalláncainak konformációs állapotát a különböző prolin-aromás kölcsönhatásokban [IV].

A *cisz*- és *transz*-EMk-nál a Pro<sup>2</sup>-Tyr<sup>1</sup>, Pro<sup>2</sup>-Trp(5)<sup>3</sup> és Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup> kölcsönhatások esetén az aromás aminosavak oldalláncainak csak egyfajta rotamere figyelhető meg, amely a Tyr<sup>1</sup> esetében a *transz* rotamer, míg a Trp<sup>3</sup> és Phe<sup>3</sup> esetében a *g*(-) rotamer. Mind a *cisz*-, mind a *transz*-EMk-nál a Pro<sup>2</sup>-Trp(6)<sup>3</sup> és Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönható párok esetén túlnyomórészt a Trp<sup>3</sup> és Phe<sup>4</sup> oldalláncainak *g*(-) rotamerei fordulnak elő, azonban a *g*(+) rotamerek is megfigyelhetők kisebb számban. Ezek-

ben a tetrapeptidekben prolin-aromás kölcsönhatások csak akkor figyelhetők meg a Pro<sup>2</sup> és az aromás aminosavak között, ha a Tyr<sup>1</sup>, Trp<sup>3</sup>/Phe<sup>3</sup> és Phe<sup>4</sup> oldalláncai a fent említett rotamer állapotokban találhatók, ugyanis csak ezekben az esetekben kerülhetnek közel egymáshoz a Pro<sup>2</sup> és az aromás gyűrűk.

### 3.7.4. Prolin-aromás kölcsönhatások a másodlagos szerkezetekben

A *cisz*- és *transz*-EMk esetén megvizsgáltuk a konformerekben kialakuló különböző típusú  $\beta$ - és  $\gamma$ -turn másodlagos szerkezeti elemekben előforduló prolin-aromás kölcsönhatásokat [IV].

A *transz*-EMk esetén főként a Pro<sup>2</sup>-Trp(6)<sup>3</sup> és Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup> kölcsönhatások figyelhetők meg a III típusú  $\beta$ -turn-ökben, míg az V típusú  $\beta$ -turn-ök leginkább Pro<sup>2</sup>-Tyr<sup>1</sup> kölcsönható párokat tartalmaznak, ugyanakkor ezekben a turn-ökben teljesen hiányoznak a Pro<sup>2</sup>-Trp(5)<sup>3</sup> és Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup> kölcsönhatások. Az N-terminális inverz  $\gamma$ -turn-nel karakterizálható konformerek esetén főként a Pro<sup>2</sup>-Trp(6)<sup>3</sup> és Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönható párok alakulnak ki a *transz*-H<sub>2</sub>N-EM1-nél, míg a Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönhatások jelennek meg nagy számban a *transz*-H<sub>2</sub>N-EM2-nél. A C-terminális  $\gamma$ -turn-t tartalmazó konformerek esetében a Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönható párok nagy populációja található meg a *transz*-H<sub>2</sub>N-EM1-nél, míg túlnyomórészt a Pro<sup>2</sup>-Tyr<sup>1</sup> és Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup> kölcsönhatások figyelhetők meg *transz*-EM2 peptideknél. A C-terminális inverz  $\gamma$ -turn-nel jellemezhető konformerek esetén a prolin-aromás kölcsönhatások majd minden típusa megtalálható, mégis ezek a struktúrák főként Pro<sup>2</sup>-Trp<sup>3</sup> kölcsönható párokat tartalmaznak a *transz*-H<sub>2</sub>N-EM1-nél.

A *cisz*-EMk esetén a Pro<sup>2</sup>-Tyr<sup>1</sup>, Pro<sup>2</sup>-Trp<sup>3</sup> és Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup> kölcsönhatások alakulnak ki jelentős mennyiségben a III típusú  $\beta$ -turn-ökben. A C-terminális  $\gamma$ -turn-öket tartalmazó, valamint a C-terminális inverz  $\gamma$ -turn-nel karakterizálható konformerek esetében túlnyomórészt a Pro<sup>2</sup>-Tyr<sup>1</sup> kölcsönható párok figyelhetők meg a *cisz*-EM1-nél, míg a Pro<sup>2</sup>-Tyr<sup>1</sup> és Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup> kölcsönhatások nagy populációi találhatók meg a *cisz*-H<sub>2</sub>N-EM2-nél.

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a *cisz*-EMk esetén a prolin-aromás kölcsönhatások nagyobb számban alakulnak ki a  $\beta$ - és  $\gamma$ -turn másodlagos szerkezeti elemekben, mint a különböző turn struktúrákban a *transz*-EMk esetében.

## 3.8. Molekuladinamikai szimulációk

A 10 ns-os explicit víz nélküli, illetve az 1 és 2 ns időtartamú explicit vizes molekuladinamikai számítások trajektóriáinak analízise [I,II] alapján hasonló megfigyeléseket tehetünk az endomorfinek különböző szerkezeti tulajdonságaira vonatkozóan, mint a szimulált anellációval és a random kereséssel előállított kon-



formerek esetében. Ugyanakkor ezen dinamikai szimulációk során a tetrapeptidek konformációjának, illetve különböző strukturális tulajdonságainak időbeli változása utal leginkább az endomorfinek nagyfokú flexibilitására.

Az EM1 és EM2 molekulák Tyr<sup>1</sup>, Pro<sup>2</sup>, Trp<sup>3</sup>/Phe<sup>3</sup> és Phe<sup>4</sup> aminosavai esetén a  $\Phi$  és  $\Psi$  torziós szögek változása a dinamikai szimuláció idejének függvényében hasonló képet mutat, mint amit a Ramachandran, pszeudo-Ramachandran, 3DR, 3DPR és parallel-koordinátás ábrákon megfigyelhetünk. A Tyr<sup>1</sup>  $\Psi_1$  torziós szöge az idő nagyrészt a  $60^\circ < \Psi < 180^\circ$ -os szögtartományon belül változik, azonban néhány ps-ig negatív értékeket is felvehet. A Pro<sup>2</sup>  $\Phi_2$  torziós szöge egy jól meghatározható intervallumon belül vesz fel értékeket, ami érthető is, hiszen ezen torziós szög esetén gátolt a szabad rotáció. A Trp<sup>3</sup>/Phe<sup>3</sup> és Phe<sup>4</sup> aminosavak  $\Phi_3$  és  $\Phi_4$  torziós szögei nagyobb mértékben változnak, azonban a konformációk többségében ezen torziós szögek értékei a  $-180^\circ < \Phi < -60^\circ$  szögtartományba esnek. A Pro<sup>2</sup>  $\Psi_2$ , a Trp<sup>3</sup>/Phe<sup>3</sup>  $\Psi_3$ , valamint a Phe<sup>4</sup>  $\Psi_4$  torziós szöge esetén tapasztalható a legnagyobb változatosság a torziós szögek értékeit illetően, ami szintén az endomorfinek flexibilitására utal. Az energia időbeli változását vizsgálva az állapítható meg, hogy a molekuladinamikai szimulációk során az energia egy adott érték körül fluktuál, és nem alakul ki egy minimum energiájú konformáció.

Az endomorfinek N-terminális N atomja és a molekulagerinc további N és O atomjai között mért minimum és maximum távolságok, valamint a távolság intervallumok a korábban megfigyeltekhez hasonló értékeket mutattak. Ez alapján arra lehet következtetni, hogy a molekuladinamikai szimulációk során is kialakulhatnak intramolekuláris H-kötések a molekulagerinc atomok között, és így megjelenhetnek a különféle turn struktúrák is. A dinamikai számítások trajektóriáinak analízise azt mutatta, hogy ebben az esetben is megfigyelhetők intramolekuláris H-kötések a Tyr<sup>1</sup>-Trp<sup>3</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>3</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>4</sup> és Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>4</sup> aminosav párok molekulagerinc atomjai között, és ezenkívül még további H-kötések is kialakulhatnak a Tyr<sup>1</sup>-NH<sub>2</sub>, Pro<sup>2</sup>-NH<sub>2</sub>, Trp<sup>3</sup>-NH<sub>2</sub> és Phe<sup>3</sup>-NH<sub>2</sub> között (az NH<sub>2</sub> minden esetben a C-terminális amidcsoportot jelenti). Az intramolekuláris H-kötésekkel összefüggésben pedig megjelennek a korábban már említett másodlagos szerkezeti elemek is: a különböző típusú  $\beta$ -turn-ök, az N-terminális inverz  $\gamma$ -turn, valamint a C-terminális  $\gamma$ - és inverz  $\gamma$ -turn-ök. A molekuladinamikai szimulációk során az endomorfinek mindkét izomere esetén megfigyelhetők voltak az I, II, III és V típusú  $\beta$ -turn-ök, valamint a C-terminális tripeptid régiókban kialakuló  $\gamma$ - és inverz  $\gamma$ -turn struktúrák, azonban az N-terminális inverz  $\gamma$ -turn-ök ebben az esetben is csak a *transz*-EMk-nál jelentek meg. Az endomorfinek flexibilitásának eredményeképpen azonban a fent említett intramolekuláris H-kötések, illetve másodlagos szerkezeti elemek csak néhány ps erejéig alakulnak ki a molekuladinamikai szimulációk során, és ezek a különböző hajlított struktúrák a H-kötések elvesztésével visszaalakulhatnak a nyújtott mole-



kulagerinccel jellemezhető konformációkba. Így egyfajta fluktuáció figyelhető meg a turn struktúrák és a nyújtott szerkezetek között, amelyet már korábban is tapasztaltak az EM1 dinamikai szimulációja során [25].

Az endomorfinek esetén a Tyr<sup>1</sup>, Trp<sup>3</sup>/Phe<sup>3</sup> és Phe<sup>4</sup> aminosavak aromás gyűrűinek, valamint a Pro<sup>2</sup> pirrolidin gyűrűjének geometriai középpontjába definiált pszeudoatomok között megfigyelhető minimum és maximum távolságok, valamint a távolság tartományok szintén a korábban említettekhez hasonló eredményeket mutattak. Az aromás gyűrűk pszeudoatomjai között megfigyelhető kisebb távolságok arra utalnak, hogy a molekuladinamikai számítások során is lehetőség nyílhat arra, hogy a Tyr<sup>1</sup>, Trp<sup>3</sup>/Phe<sup>3</sup> és Phe<sup>4</sup> aminosavak aromás oldalláncai a térben közel kerüljenek egymáshoz és közöttük különböző aromás-aromás kölcsönhatások alakuljanak ki. A Pro<sup>2</sup> pirrolidin gyűrűje és az aromás aminosavak gyűrűi között tapasztalható kisebb pszeudoatom távolságok pedig arra engednek következtetni, hogy a Pro<sup>2</sup> gyűrűje és a Tyr<sup>1</sup>, Trp<sup>3</sup>/Phe<sup>3</sup> és Phe<sup>4</sup> aminosavak aromás gyűrűi között is létrejöhetnek különféle prolin-aromás kölcsönhatások a dinamikai szimulációk során. Az intramolekuláris H-kötésekhez és a másodlagos szerkezeti elemekhez hasonlóan ezek a kölcsönható aromás és prolin-aromás párok szintén csak néhány ps-ig figyelhetők meg a molekuladinamikai számítások során, és ez ugyancsak az endomorfinek flexibilitásával magyarázható.

## 4. Konklúzió

Az endomorfinek különböző módszerekkel (szimulált anelláció, random keresés, molekuladinamika) elvégzett konformáció-analízise azt mutatja, hogy az EM1 és EM2 molekulák nagy flexibilitással rendelkező tetrapeptidek. Erre utal az endomorfinek konformációjának időbeli változása a molekuladinamikai szimulációk során, ahol megfigyelhető a különböző másodlagos szerkezeti elemek és a nyújtott molekulagerinccel rendelkező struktúrák közötti fluktuáció. Mindemellett a flexibilitásra utal az is, hogy az N-terminális N atom és a molekulagerinc további N és O atomjai közötti távolságok, valamint a Tyr<sup>1</sup>, Pro<sup>2</sup>, Trp<sup>3</sup>/Phe<sup>3</sup> és Phe<sup>4</sup> aminosavak gyűrűinek geometriai középpontjába definiált pszeudoatomok közötti távolságok egyaránt széles tartományban változnak. A molekulagerinc atomok között megfigyelhető nagyobb távolságok a nyújtott molekulagerinccel rendelkező szerkezeteket, míg a kisebb távolságok a különféle hajlított struktúrákat jellemzik.

A hajlított molekulagerinccel jellemezhető konformerekben az aminosavak molekulagerinc atomjai között többféle intramolekuláris H-kötés kialakulására van lehetőség. A Tyr<sup>1</sup>-Trp<sup>3</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>3</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>4</sup> és Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>4</sup> aminosav párok között megfigyelhető H-kötések utalnak a különböző típusú  $\beta$ - és  $\gamma$ -turn másodlagos szerkezeti elemek jelenlétére. Mindemellett azonban még további H-kötések is kialakulhatnak az endomorfinekben egyrészt a molekulagerinc atomok, másrészt a molekulagerinc és az oldallánc atomok részvételével. A különféle hajlított struktúrákban ezenfelül előfordulnak különböző bifurkált H-kötések (bifurkáció és inverz bifurkáció) is, amelyek tovább stabilizálhatják ezeket a szerkezeteket.

Az endomorfinek konformereiben különböző típusú  $\beta$ - és  $\gamma$ -turn struktúrák alakulhatnak ki, amelyek többségét a Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>4</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Trp<sup>3</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>3</sup> és Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>4</sup> aminosavak között létrejövő 1 $\leftarrow$ 4, 1 $\leftarrow$ 3 és 2 $\leftarrow$ 4 intramolekuláris H-kötések stabilizálják. A  $\beta$ -turn másodlagos szerkezetek közül a *transz*-EMk esetén leginkább a III és V típusú  $\beta$ -turn-ök figyelhetők meg, míg a *cisz*-EMk esetében a III típusú  $\beta$ -turn populációja bizonyult a legnagyobbnak, ugyanakkor a *cisz* izomerek konformereiben nem találhatók meg az V típusú  $\beta$ -turn-ök. Emellett a *transz*-EMk esetén az N-terminális tripeptid egységekben (Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Trp<sup>3</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup>) kialakulnak inverz  $\gamma$ -turn struktúrák, amelyek a *cisz*-EMk esetében egyáltalán nem figyelhetők meg. Mindkét izomer konformereiben megtalálhatók azonban a  $\gamma$ - és inverz  $\gamma$ -turn másodlagos szerkezetek a C-terminális tripeptid egységekben (Pro<sup>2</sup>-Trp<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup>, Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup>). Ezenkívül az endomorfinek *transz* izomerei esetén előfordulnak ún. inverz  $\gamma$  -  $\gamma$ , inverz  $\gamma$  - inverz  $\gamma$ , inverz  $\gamma$  -  $\beta$ , illetve  $\beta$  -  $\gamma$  átfedő turn struktúrák is.

A H-kötések mellett azonban még egyéb intramolekuláris kölcsönhatások is szerepet játszhatnak az endomorfinek különböző konformációs állapotainak stabilizálásában, ugyanis a pszeudoatomok között mért kisebb távolságok arra enged-

nek következtetni, hogy ezekben a tetrapeptidekben kialakulhatnak különböző aromás-aromás és prolin-aromás kölcsönhatások. A *transz*-EMk konformerei esetén a Tyr<sup>1</sup>-Trp<sup>3</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>3</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>4</sup>, Trp<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> és Phe<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> aminosav párok oldalláncai között létrejövő aromás-aromás kölcsönhatások nagyobb számban fordulnak elő, mint a *cisz*-EMk konformereiben. A kölcsönható aromás párok többsége esetén megjelenik néhány preferált geometriai orientáció, illetve az aromás-aromás kölcsönhatások minden egyes típusánál megfigyelhető egy, két vagy néhány nagy populációjú rotamer kombináció. A tetrapeptidek konformereiben nagyobb számban alakulnak ki a Pro<sup>2</sup>-Tyr<sup>1</sup> kölcsönható párok, mint a Pro<sup>2</sup>-Trp<sup>3</sup>, Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup> és Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönhatások. Ugyanakkor a *cisz*-EMk esetén a Pro<sup>2</sup>-Tyr<sup>1</sup> kölcsönható párok nagyobb arányban fordulnak elő, mint a *transz*-EMk-nál. A különböző típusú prolin-aromás kölcsönhatások esetében csak egy vagy két preferált geometriai orientáció figyelhető meg, amelyek tekintetében az endomorfinek két izomere között hasonlóság tapasztalható. A prolin-aromás párok esetén a pirrolidin gyűrűvel kölcsönható aromás aminosavak oldalláncainak adott rotamer állapottal kell rendelkezniük ahhoz, hogy kialakulhassanak a prolin-aromás kölcsönhatások. Az endomorfinek konformereiben előforduló másodlagos szerkezeti elemek (III és V típusú  $\beta$ -turn-ök, N-terminális inverz  $\gamma$ -turn-ök, C-terminális  $\gamma$ - és inverz  $\gamma$ -turn-ök) többsége jellemezhető valamilyen aromás-aromás vagy prolin-aromás kölcsönhatással. A *transz*-EMk esetén nagyobb arányban figyelhetők meg a kölcsönható aromás párok a különböző turn struktúrákban, mint a *cisz*-EMk-nál. Ugyanakkor a *cisz*-EMk esetében a prolin-aromás kölcsönhatások nagyobb számban alakulnak ki a  $\beta$ - és  $\gamma$ -turn-ökben, mint a *transz*-EMk-nál. Az EM1 és EM2 konformerei között megfigyelhetők olyan struktúrák, amelyekben egyidejűleg fordul elő két különböző típusú aromás-aromás vagy prolin-aromás kölcsönhatás, illetve találhatók olyan konformerek is, amelyekben egy aromás-aromás és egy prolin-aromás kölcsönhatás alakul ki egyidőben. Az endomorfinek azon *cisz* izomereiben, amelyek Pro<sup>2</sup>-Tyr<sup>1</sup> és Pro<sup>2</sup>-Trp<sup>3</sup>/Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup> kölcsönható párokat, vagy Pro<sup>2</sup>-Tyr<sup>1</sup> és Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönhatásokat tartalmaznak egyidejűleg, kialakulhat egy ún. kompakt „szendvics” struktúra [25,26,29], amelyben az aromás aminosavak oldalláncai két oldalról közrefogják a Pro<sup>2</sup> pirrolidin gyűrűjét.

Az endomorfinek receptorhoz kötődése során a molekulagerinc struktúrája mellett fontos az aromás oldalláncok relatív térbeli elrendeződése is, ugyanis ezen tetrapeptidek esetén az egyes pozíciójú Tyr, valamint a hármas vagy négyes pozíciójú Trp és Phe is a lehetséges farmakofór elemek közé tartoznak [25,26]. Az aromás aminosavak oldalláncai között kialakuló aromás-aromás, illetve a Tyr, Trp és Phe aminosavak aromás gyűrűi és a Pro pirrolidin gyűrűje között létrejövő prolin-aromás kölcsönhatások esetén a farmakofór oldalláncok térbeli elrendeződése jól meghatározott a különböző geometriai orientációk és rotamer kombinációk



által. Jól ismert, hogy a kölcsönható aromás párok jelentős szerepet töltenek be a peptidek háromdimenziós szerkezetének stabilizálásában [88,93,94]. Az endomorfinkban előforduló aromás-aromás kölcsönhatások populációi azt sugallják, hogy ezeknek a kölcsönhatásoknak fontos szerepe lehet az EM1 és EM2 különböző konformációs állapotainak a kialakításában és stabilizálásában. Ugyanakkor az is ismeretes, hogy a kölcsönható prolin-aromás párok egyrészt a *cisz* peptidkötés, másrészt pedig a  $\beta$ -turn struktúrák szerkezetének stabilizálásában játszanak fontos szerepet [91,92,95]. A *cisz*-EMk esetén megfigyelhető Pro<sup>2</sup>-Tyr<sup>1</sup> kölcsönhatások arra engednek következtetni, hogy ezek a kölcsönható prolin-aromás párok hozzájárulhatnak a *cisz* peptidkötés stabilizálásához. A különböző típusú  $\beta$ - és  $\gamma$ -turn-ök esetében megfigyelhető, hogy ezek a turn struktúrák nagyrészt tartalmaznak valamilyen típusú aromás-aromás vagy prolin-aromás kölcsönhatást. Az intramolekuláris H-kötéssel rendelkező turn szerkezetekben megjelenő kölcsönható aromás és prolin-aromás párok egy további stabilizáló hatást eredményezhetnek. Az endomorfink esetén azonban olyan turn struktúrák is előfordulnak, amelyekben hiányzik az intramolekuláris H-kötés, és ezekben az esetekben az aromás-aromás és prolin-aromás kölcsönhatások fontos szerepet játszhatnak a konformerek szerkezetének stabilizálásában.

Az endomorfink különböző módszerekkel elvégzett konformáció-analízise alapján megállapítható, hogy mind a *cisz*, mind a *transz* izomer esetén jelentős a nyújtott szerkezetek aránya, így akár a *cisz*, akár a *transz* izomer nyújtott molekulagerinccel rendelkező konformere is lehet bioaktív, ahogy azt az EM1 és az EM2 esetén korábban javasolták [25,26,29]. A nyújtott szerkezetek mellett azonban nagy számban alakulnak ki különböző  $\beta$ - és  $\gamma$ -turn struktúrák is, ezért lehetséges az is, hogy ezek a hajlított molekulagerinccel jellemezhető szerkezetek jelentik a bioaktív konformációt. Adott esetben pl. a III típusú 1 $\leftarrow$ 4  $\beta$ -turn is lehet bioaktív, ahogy azt biciklikus  $\beta$ -turn peptidomimetikumok vizsgálata alapján javasolták [30].

A *message-address* koncepció [27] alapján az endomorfink esetén a *message* fragmensek az N-terminális Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Trp<sup>3</sup> és Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup> tripeptid egységek [28], amelyek fontos szerepet játszanak a receptorhoz kötődés során. Ezekben az N-terminális tripeptid régiókban a *transz*-EMk esetén nagy számban fordul elő inverz  $\gamma$ -turn struktúra, míg a *cisz*-EMk esetében ez a másodlagos szerkezeti elem egyáltalán nem figyelhető meg. Mindezek figyelembevételével azt a javaslatot tettük, hogy az endomorfink esetén a lehetséges bioaktív konformer *transz* Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> peptidkötést tartalmaz, és az N-terminális tripeptid régióban inverz  $\gamma$ -turn struktúrával jellemezhető [I,II]. Ha valóban szükséges az inverz  $\gamma$ -turn struktúra az aktivitás kifejeződéséhez, akkor az endomorfink *cisz* izomere nem lehet bioaktív, hiszen ebben az esetben az N-terminális tripeptid egységben egyáltalán nem alakul ki inverz  $\gamma$ -turn szerkezet. Egy közlés alatt lévő munkában Gentilucci és mts. [96]

aktív ciklikus EM1 analógok szerkezetét vizsgálták NMR spektroszkópia és modellezési módszerek alkalmazásával. Eredményeik alapján arra a következtetésre jutottak, hogy az EM1 és az EM1-hez hasonló  $\mu$ -opioid peptidek bioaktív konformációja az N-terminális tripeptid régióban előforduló inverz  $\gamma$ -turn struktúrával jellemezhető. Ez a következtetés megegyezik az általunk két évvel korábban javasolt, az endomorfinek bioaktív szerkezetére vonatkozó felvetéssel [I,II].

Az irodalomban tehát meglehetősen eltérő elképzelések láttak napvilágot az EM1 és EM2 bioaktív szerkezetével kapcsolatban. Éppen ezért ezen tetrapeptidek bioaktív konformációjának pontos meghatározásához, valamint a másodlagos szerkezeti elemek és a különböző intramolekuláris kölcsönhatások szerepének tisztázásához további vizsgálatok szükségesek. Ehhez mindenekelőtt meg kell ismernünk a  $\mu$ -opioid receptor pontos háromdimenziós szerkezetét, valamint részletesen fel kell térképeznünk a ligand kötőhelyet. Amennyiben rendelkezésünkre állnak ezek az adatok is, akkor sor kerülhet a  $\mu$ -opioid receptor és az endomorfinek, illetve egyéb opioid peptidek együttes térszerkezeti vizsgálatára, amely közelebb vihet minket ezen tetrapeptidek bioaktív konformációjának azonosításához.

## 5. Összefoglaló

Az endomorfín-1 (EM1, H-Tyr-Pro-Trp-Phe-NH<sub>2</sub>) és endomorfín-2 (EM2, H-Tyr-Pro-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>) aktív és szelektív  $\mu$ -opioid receptor agonisták, amelyek számos jelentős biológiai hatással rendelkeznek az emlősök szervezetében. Ezek a tetrapeptidok szerepet játszanak a fájdalomérzékelés szabályozásában és a fájdalomcsillapításban, valamint komplex hatást mutatnak a vérkeringési rendszerben, illetve szabályozzák az ingerületátvivő anyagok szabadon bocsátását, továbbá immunmoduláló hatással is rendelkeznek.

Az endomorfínok konformáció-analízisét végeztük el különböző módszerek (szimulált anelláció, random keresés, molekuladinamika) alkalmazásával. A tetrapeptidokat az N-terminális amino-csoport semleges (NH<sub>2</sub>-), illetve protonált (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-) állapotának megfelelően kétféleképpen modelleztük. Mivel az NMR adatok azt mutatják, hogy az endomorfínok a Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> peptidkötés *cisz*, illetve *transz* állapotának megfelelő izomerek egyensúlyi keverékeként vannak jelen, ezért a számításokat mindkét izomerre külön-külön elvégeztük.

A  $\Phi$ - $\Psi$  konformációs terek, illetve a konformerek eloszlásainak jellemzésére Ramachandran, pszeudo-Ramachandran, 3DR, 3DPR és parallel-koordinátás ábrákat készítettünk a Tyr<sup>1</sup>, Pro<sup>2</sup>, Trp<sup>3</sup>/Phe<sup>3</sup> és Phe<sup>4</sup> aminosavak  $\Phi$  és  $\Psi$  torziós szögeinek felhasználásával. A különböző típusú Ramachandran ábrákon meghatároztuk a konformerek által preferált tartományokat, továbbá ezen ábrák és a konformációs hasonlósági indexek alapján összehasonlítottuk a konformációs eloszlásokat. A Tyr<sup>1</sup>, Trp<sup>3</sup>/Phe<sup>3</sup> és Phe<sup>4</sup> aminosavak oldalláncai esetén meghatároztuk a konformerekben előforduló *g*(+), *g*(-) és *transz* rotamer populációk arányait, továbbá ezen oldalláncok rotamer kombinációit is azonosítottuk.

Kétféle távolságmérést végeztünk el a tetrapeptidokra vonatkozóan. Egyik esetben az N-terminális N atom és a molekulagerinc további N és O atomjai közötti távolságokat mértük meg, míg a másik esetben a Tyr<sup>1</sup>, Trp<sup>3</sup>/Phe<sup>3</sup> és Phe<sup>4</sup> oldalláncok aromás gyűrűinek, valamint a Pro<sup>2</sup> pirrolidin gyűrűjének geometriai középontjába definiált pszeudoatomok közötti távolságokat határoztuk meg. A molekulagerinc atomok közötti kisebb távolságok a különféle hajlított struktúrákat, míg a nagyobb távolságok a nyújtott molekulagerinccel rendelkező konformereket jellemzik. A pszeudoatomok között mért kisebb távolságok azt mutatják, hogy ezekben a tetrapeptidokban kialakulhatnak különböző aromás-aromás és prolin-aromás kölcsönhatások.

Meghatároztuk az endomorfínok konformereiben kialakuló intramolekuláris H-kötések típusait és populációit. A hajlított molekulagerinccel jellemezhető konformerekben az aminosavak molekulagerinc atomjai között többféle intramolekuláris H-kötés alakulhat ki. A Tyr<sup>1</sup>-Trp<sup>3</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>3</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>4</sup> és Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>4</sup> aminosav



párok között megfigyelhető H-kötések utalnak a különböző típusú  $\beta$ - és  $\gamma$ -turn másodlagos szerkezetek jelenlétére. Mindemellett azonban még további H-kötések is kialakulhatnak az endomorfinkban egyrészt a molekulagerinc atomok, másrészt a molekulagerinc és az oldallánc atomok között. A különféle hajlított struktúrákban ezenfelül előfordulnak különböző bifurkált H-kötések (bifurkáció és inverz bifurkáció) is, amelyek tovább stabilizálhatják ezeket a szerkezeteket.

Azonosítottuk az endomorfink konformereiben előforduló másodlagos szerkezeti elemeket. Ezekben a tetrapeptidekben különböző típusú  $\beta$ - és  $\gamma$ -turn struktúrák alakulhatnak ki, amelyek többségét a Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>4</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Trp<sup>3</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>3</sup> és Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>4</sup> aminosavak közötti 1 $\leftarrow$ 4, 1 $\leftarrow$ 3 és 2 $\leftarrow$ 4 intramolekuláris H-kötések stabilizálják. A  $\beta$ -turn másodlagos szerkezetek közül a *transz*-EMk esetén leginkább a III és V típusú  $\beta$ -turn-ök figyelhetők meg, míg a *cisz*-EMk esetében a III típusú  $\beta$ -turn populációja bizonyult a legnagyobbnak, ugyanakkor a *cisz* izomerek konformereiben nem találhatók meg az V típusú  $\beta$ -turn-ök. Emellett a *transz*-EMk esetén az N-terminális tripeptid egységekben (Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Trp<sup>3</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup>) kialakulnak inverz  $\gamma$ -turn struktúrák, amelyek a *cisz*-EMk esetében egyáltalán nem figyelhetők meg. Mindkét izomer konformereiben megtalálhatók azonban a  $\gamma$ - és inverz  $\gamma$ -turn másodlagos szerkezetek a C-terminális tripeptid egységekben (Pro<sup>2</sup>-Trp<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup>, Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup>). Ezenkívül az endomorfink *transz* izomerei esetén előfordulnak ún. inverz  $\gamma$  -  $\gamma$ , inverz  $\gamma$  - inverz  $\gamma$ , inverz  $\gamma$  -  $\beta$ , illetve  $\beta$  -  $\gamma$  átfedő turn struktúrák is.

A H-kötések mellett egyéb intramolekuláris kölcsönhatások (aromás-aromás és prolin-aromás kölcsönhatások) is szerepet játszhatnak az endomorfink különböző konformereinek stabilizálásában. Az endomorfink Tyr<sup>1</sup>-Trp<sup>3</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>3</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>4</sup>, Trp<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> és Phe<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> aminosav párpainak aromás oldalláncai esetén meghatároztuk a kialakuló aromás-aromás kölcsönhatások populációit. Ezt követően azonosítottuk a kölcsönható aromás gyűrűk preferált geometriai orientációit, illetve a kölcsönhatásokban résztvevő oldalláncok rotamer kombinációit. Az endomorfinkban előforduló aromás-aromás kölcsönhatások populációi azt sugallják, hogy ezeknek a kölcsönható pároknak fontos szerepe lehet az EM1 és EM2 különböző konformereinek kialakításában és stabilizálásában. A tetrapeptidek Pro<sup>2</sup>-Tyr<sup>1</sup>, Pro<sup>2</sup>-Trp<sup>3</sup>, Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup> és Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>4</sup> aminosav párpai esetében meghatároztuk a kialakuló prolin-aromás kölcsönhatások populációit, illetve azonosítottuk, hogy a Pro<sup>2</sup> pirrolidin gyűrűjének melyik C atomja vesz részt a különböző prolin-aromás kölcsönhatásokban. Ebben az esetben is azonosítottuk a prolin és az aromás gyűrűk kölcsönhatásakor kialakuló preferált geometriai orientációkat, illetve a pirrolidin gyűrűvel kölcsönható aromás oldalláncok rotamer populációit. A *cisz*-EMk esetén megfigyelhető Pro<sup>2</sup>-Tyr<sup>1</sup> kölcsönhatások arra utalnak, hogy ezek a kölcsönható prolin-aromás párok hozzájárulhatnak a *cisz* peptidkötés stabilizálásához. Végül megvizsgáltuk az endomorfink konformereiben előforduló másod-

lagos szerkezeti elemekben (III és V típusú  $\beta$ -turn-ök, N-terminális inverz  $\gamma$ -turn-ök, C-terminális  $\gamma$ - és inverz  $\gamma$ -turn-ök) jelenlévő aromás-aromás és prolin-aromás kölcsönhatások típusait. A különböző  $\beta$ - és  $\gamma$ -turn másodlagos szerkezetek esetén megfigyelhető, hogy ezen turn-ök többsége tartalmaz valamilyen aromás-aromás vagy prolin-aromás kölcsönhatást. Az intramolekuláris H-kötéssel rendelkező turn struktúrák esetén a kölcsönható aromás és prolin-aromás párok egy további stabilizáló hatást eredményezhetnek. Az endomorfinek esetén azonban olyan turn-ök is megfigyelhetők, amelyekben hiányoznak az intramolekuláris H-kötések, és ezekben az esetekben az aromás-aromás és prolin-aromás kölcsönhatások fontos szerepet játszhatnak a konformerek stabilizálásában. Az EM1 és EM2 konformerei között találhatók olyan struktúrák, amelyekben egyidejűleg fordul elő két különböző aromás-aromás vagy prolin-aromás kölcsönhatás, illetve megfigyelhetők olyan konformerek is, amelyekben egy aromás-aromás és egy prolin-aromás kölcsönhatás alakul ki egyidőben. Az endomorfinek azon *cisz* izomereiben, amelyek Pro<sup>2</sup>-Tyr<sup>1</sup> és Pro<sup>2</sup>-Trp<sup>3</sup>/Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup> kölcsönható párokat, vagy Pro<sup>2</sup>-Tyr<sup>1</sup> és Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>4</sup> kölcsönhatásokat tartalmaznak egyidejűleg, kialakulhat egy ún. kompakt „szendvics” struktúra, amelyben az aromás aminosavak oldalláncai közrefogják a Pro<sup>2</sup> pirrolidin gyűrűjét.

Molekulamodellelési munkánk során meghatároztuk az endomorfinek preferált konformációs állapotait, a jellegzetes másodlagos szerkezeti elemeket, illetve az ezeket stabilizáló különböző intramolekuláris kölcsönhatásokat. A tetrapeptidek konformáció-analíziséből kapott eredmények alapján javaslatot tettünk az EM1 és EM2 lehetséges bioaktív konformációjára, valamint a stabilizáló kölcsönhatások szerepére vonatkozóan.

## 6. Summary

Endomorphin-1 (EM1, H-Tyr-Pro-Trp-Phe-NH<sub>2</sub>) and endomorphin-2 (EM2, H-Tyr-Pro-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>) are active and selective  $\mu$ -opioid receptor agonists, which possess several important biological effects in the mammalian organisms. These tetrapeptides play a role in the regulation of pain perception and in the analgesia, as well as they show complex effect in the cardiovascular system, and they regulate the release of neurotransmitters, furthermore they have immunomodulatory properties, too.

The conformational analysis of the endomorphins were performed with the use of different methods including simulated annealing, random search and molecular dynamics. The tetrapeptides were modeled in both states: neutral (NH<sub>2</sub>-) and protonated (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-) forms of the N-terminal amino-group. As the NMR data reveal that the endomorphins exist an equilibrium mixture of the isomers possessing either *cis* or *trans* Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> peptide bonds, therefore the calculations were performed on both isomers.

In order to characterize the  $\Phi$ - $\Psi$  conformational spaces and the distributions of the conformers, Ramachandran, pseudo-Ramachandran, 3DR, 3DPR and parallel-coordinates plots were constructed using the  $\Phi$  and  $\Psi$  torsion angles of the Tyr<sup>1</sup>, Pro<sup>2</sup>, Trp<sup>3</sup>/Phe<sup>3</sup> and Phe<sup>4</sup> amino acids. In the Ramachandran plots of various type, the regions preferred by the conformers were determined, furthermore using these plots and the conformational similarity indices, the conformational distributions were compared to each other. For the side-chains of the Tyr<sup>1</sup>, Trp<sup>3</sup>/Phe<sup>3</sup> and Phe<sup>4</sup> amino acids, the ratios of the *g*(+), *g*(-) and *trans* rotamer populations occurred in the conformers were determined, additionally the rotamer combinations of these side-chains were also identified.

Distance measurement of two different kinds were performed on the tetrapeptides. In the first case, the distances between the N-terminal N atom and the other N and O atoms of the peptide backbone were measured, while in the second case, the distances between the geometric centers of the aromatic side-chain rings of Tyr<sup>1</sup>, Trp<sup>3</sup>/Phe<sup>3</sup> and Phe<sup>4</sup> as well as the center of the pyrrolidin ring of Pro<sup>2</sup> defined as pseudo atoms were measured. The shorter distances between the backbone atoms characterize the various bent structures, while the larger ones feature the conformers with extended backbone. The shorter distances measured between the pseudoatoms show that different aromatic-aromatic and proline-aromatic interactions can be formed in these tetrapeptides.

The types and populations of intramolecular H-bonds emerged in the conformers of the endomorphins were determined. In the conformers characterized by a bent backbone, various intramolecular H-bonds can be formed between the



backbone atoms of amino acids. The observable H-bonds between the Tyr<sup>1</sup>-Trp<sup>3</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>3</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>4</sup> and Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>4</sup> amino acid pairs refer to the presence of different types of  $\beta$ - and  $\gamma$ -turn secondary structures. Nevertheless, additional H-bonds can evolve in the endomorphins, on the one hand between the backbone atoms, and on the other hand between the backbone and side-chain atoms. Furthermore, in the various bent structures, different bifurcated H-bonds (bifurcation and inverse bifurcation) also occur, which can further stabilize these structures.

The secondary structural elements occurred in the conformers of the endomorphins were identified. In these tetrapeptides, different types of  $\beta$ - and  $\gamma$ -turn structures can be formed, and the majority of them are stabilized by 1 $\leftarrow$ 4, 1 $\leftarrow$ 3 and 2 $\leftarrow$ 4 intramolecular H-bonds formed between the Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>4</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Trp<sup>3</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>3</sup> and Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>4</sup> amino acids. Among the  $\beta$ -turn secondary structures, mainly the types III and V  $\beta$ -turns can be observed for *trans*-EMs, while the population of type III  $\beta$ -turn was the largest for *cis*-EMs, although the type V  $\beta$ -turns cannot be found in the conformers of *cis* isomers. Moreover for *trans*-EMs, inverse  $\gamma$ -turns appeared in the N-terminal tripeptide parts (Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Trp<sup>3</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup>), which cannot be observed at all for the *cis*-EMs. However in the conformers of both isomers,  $\gamma$ - and inverse  $\gamma$ -turns can be found in the C-terminal tripeptide parts (Pro<sup>2</sup>-Trp<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup>, Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup>). In addition for the *trans* isomers of the endomorphins, a so-called inverse  $\gamma$  -  $\gamma$ , inverse  $\gamma$  - inverse  $\gamma$ , inverse  $\gamma$  -  $\beta$  and  $\beta$  -  $\gamma$  multiple turn structures occur.

Besides the H-bonds, other intramolecular interactions (aromatic-aromatic and proline-aromatic interactions) may play a role in the stabilization of the different conformers of the endomorphins. In the cases of aromatic side-chains of the Tyr<sup>1</sup>-Trp<sup>3</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>3</sup>, Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>4</sup>, Trp<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> and Phe<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> amino acid pairs of the endomorphins, the populations of emerging aromatic-aromatic interactions were determined. After this, the preferred geometric orientations of the interacting aromatic rings and the rotamer combinations of the side-chains participating in the interactions were identified. The populations of aromatic-aromatic interactions occurred in the endomorphins suggest that these interacting pairs may have an important role in the formation and stabilization of the various conformers of EM1 and EM2. In the cases of the Pro<sup>2</sup>-Tyr<sup>1</sup>, Pro<sup>2</sup>-Trp<sup>3</sup>, Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup> and Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>4</sup> amino acid pairs of the tetrapeptides, the populations of the proline-aromatic interactions were determined, and the C atoms of the pyrrolidin ring of Pro<sup>2</sup> taking part in the different proline-aromatic interactions were identified. Just as before, the preferred geometric orientations resulted by the interactions between the proline and aromatic rings, as well the rotamer populations of the aromatic side-chains interacted with the pyrrolidin ring were also identified. For the *cis*-EMs, the

observable Pro<sup>2</sup>-Tyr<sup>1</sup> interactions imply that these interacting proline-aromatic pairs may contribute to the stabilization of *cis* peptide bond. Finally, the types of aromatic-aromatic and proline-aromatic interactions appearing in the secondary structural elements (types III and V  $\beta$ -turns, N-terminal inverse  $\gamma$ -turns, C-terminal  $\gamma$ - and inverse  $\gamma$ -turns) occurred in the conformers of the endomorphins were examined. In the case of different  $\beta$ - and  $\gamma$ -turn secondary structures, it can be observed that the majority of these turns contain a sort of aromatic-aromatic or proline-aromatic interactions. For the turn structures with intramolecular H-bonds, the interacting aromatic and proline-aromatic pairs can result in a further stabilizing effect. However, for the endomorphins, such turns can be observed, in which the intramolecular H-bonds are absent, and in these cases, the aromatic-aromatic and proline-aromatic interactions may play an important role in the stabilization of the conformers. Among the conformers of EM1 and EM2, structures with two simultaneous aromatic-aromatic or proline-aromatic interactions can be found, as well as conformers containing one aromatic-aromatic and one proline-aromatic interaction at the same time can be observed. In the *cis* isomers of the endomorphins containing Pro<sup>2</sup>-Tyr<sup>1</sup> and Pro<sup>2</sup>-Trp<sup>3</sup>/Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup> interacting pairs, or Pro<sup>2</sup>-Tyr<sup>1</sup> and Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>4</sup> interactions, a so-called compact sandwich structure can be formed, in which the side-chains of the aromatic amino acids are packed against the pyrrolidin ring of Pro<sup>2</sup>.

In the course of our molecular modeling study, we determined the preferred conformational states of the endomorphins, and the characteristic secondary structural elements, as well the different stabilizing intramolecular interactions. Based on the results obtained from the conformational analysis of the tetrapeptides, we made a proposal for the possible bioactive conformation of EM1 and EM2, as well as for the role of the stabilizing interactions.

## 7. Irodalomjegyzék

- [1] Zadina, J. E., Hackler, L., Ge, L.-J., Kastin, A. J.: A potent and selective endogenous agonist for the  $\mu$ -opiate receptor. *Nature* **386(6624)**, 499-502 (1997)
- [2] Martin-Schild, S., Zadina, J. E., Gerall, A. A., Vigh, S., Kastin, A. J.: Localization of endomorphin-2-like immunoreactivity in the rat medulla and spinal cord. *Peptides* **18(10)**, 1641-1649 (1997)
- [3] Hackler, L., Zadina, J. E., Ge, L.-J., Kastin, A. J.: Isolation of relatively large amounts of endomorphin-1 and endomorphin-2 from human brain cortex. *Peptides* **18(10)**, 1635-1639 (1997)
- [4] Jessop, D. S., Major, G. N., Coventry, T. L., Kaye, S. J., Fulford, A. J., Harbuz, M. S., De Bree, F. M.: Novel opioid peptides endomorphin-1 and endomorphin-2 are present in mammalian immune tissues. *J. Neuroimmunol.* **106(1-2)**, 53-59 (2000)
- [5] Horvath, G.: Endomorphin-1 and endomorphin-2: pharmacology of the selective endogenous  $\mu$ -opioid receptor agonists. *Pharmacol. Therapeut.* **88(3)**, 437-463 (2000)
- [6] Stone, L. S., Fairbanks, C. A., Laughlin, T. M., Nguyen, H. O., Bushy, T. M., Wessendorf, M. W., Wilcox, G. L.: Spinal analgesic actions of the new endogenous peptides endomorphin-1 and -2. *Neuroreport* **8(14)**, 3131-3135 (1997)
- [7] Goldberg, I. E., Rossi, G. C., Letchworth, S. R., Mathis, J. P., Ryan-Moro, J., Leventhal, L., Su, W., Emmel, D., Bolan, E. A., Pasternak, G. W.: Pharmacological characterization of endomorphin-1 and endomorphin-2 in mouse brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **286(2)**, 1007-1013 (1998)
- [8] Loh, H. H., Liu, H.-C., Cavalli, A., Yang, W., Chen, Y.-F., Wei, L.-N.:  $\mu$  Opioid receptor knockout in mice: effects on ligand-induced analgesia and morphine lethality. *Mol. Brain Res.* **54(2)**, 321-326 (1998)
- [9] Champion, H. C., Zadina, J. E., Kastin, A. J., Kadowitz, P. J.: Endomorphin 1 and 2 have vasodepressor activity in the anesthetized mouse. *Peptides* **19(5)**, 925-929 (1998)
- [10] Champion, H. C., Zadina, J. E., Kastin, A. J., Hackler, L., Ge, L.-J., Kadowitz, P. J.: Endomorphin 1 and 2, endogenous ligands for the  $\mu$ -opioid receptor, decrease cardiac output, and total peripheral resistance in the rat. *Peptides* **18(9)**, 1393-1397 (1997)
- [11] Czapla, M. A., Champion, H. C., Zadina, J. E., Kastin, A. J., Hackler, L., Ge, L.-J., Kadowitz, P. J.: Endomorphin 1 and 2, endogenous  $\mu$ -opioid agonists, decrease systemic arterial pressure in the rat. *Life Sci.* **62(13)**, 175-179 (1998)



- [12] Kwok, E. H., Dun, N. J.: Endomorphins decrease heart rate and blood pressure possibly by activating vagal afferents in anesthetized rats. *Brain Res.* **803(1-2)**, 204-207 (1998)
- [13] Champion, H. C., Zadina, J. E., Kastin, A. J., Hackler, L., Ge, L.-J., Kadowitz, P. J.: The endogenous mu-opioid receptor agonists endomorphins 1 and 2 have novel hypotensive activity in the rabbit. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **235(3)**, 567-570 (1997)
- [14] Champion, H. C., Bivalacqua, T. J., Lambert, D. G., McWilliams, S. M., Zadina, J. E., Kastin, A. J., Kadowitz, P. J.: Endomorphin 1 and 2, the endogenous  $\mu$ -opioid agonists, produce biphasic changes in systemic arterial pressure in the cat. *Life Sci.* **63(9)**, 131-136 (1998)
- [15] Champion, H. C., Zadina, J. E., Kastin, A. J., Kadowitz, P. J.: The endogenous  $\mu$ -opioid agonists, endomorphin 1 and 2, have vasodilator activity in the hindquarters vascular bed of the rat. *Life Sci.* **61(26)**, 409-415 (1997)
- [16] Czapla, M. A., Gozal, D., Alea, O. A., Beckerman, R. C., Zadina, J. E.: Differential cardiorespiratory effects of endomorphin-1, endomorphin-2, DAMGO, and morphine. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **162(3)**, 994-999 (2000)
- [17] Lippl, F., Schusdziarra, V., Allescher, H. D.: Effect of endomorphin on somatostatin secretion in the isolated perfused rat stomach. *Neuropeptides* **35(5-6)**, 303-309 (2001)
- [18] Dun, N. J., Dun, S. L., Wu, S. Y., Williams, C. A., Kwok, E. H.: Endomorphins: localization, release and action on rat dorsal horn neurons. *J. Biomed. Sci.* **7(3)**, 213-220 (2000)
- [19] Nishiwaki, H., Saitoh, N., Nishio, H., Takeuchi, T., Hata, F.: Inhibitory effect of endomorphin-1 and -2 on acetylcholine release from myenteric plexus of guinea pig ileum. *Jpn. J. Pharmacol.* **78(1)**, 83-86 (1998)
- [20] Patel, H. J., Venkatesan, P., Halfpenny, J., Yacoub, M. H., Fox, A., Barnes, P. J., Belvisi, M. G.: Modulation of acetylcholine release from parasympathetic nerves innervating guinea-pig and human trachea by endomorphin-1 and -2. *Eur. J. Pharmacol.* **374(1)**, 21-24 (1999)
- [21] Azuma, Y., Wang, P.-L., Shinohara, M., Ohura, K.: Immunomodulation of the neutrophil respiratory burst by endomorphins 1 and 2. *Immunol. Lett.* **75(1)**, 55-59 (2000)
- [22] Azuma, Y., Ohura, K., Wang, P.-L., Shinohara, M.: Endomorphins delay constitutive apoptosis and alter the innate host defense functions of neutrophils. *Immunol. Lett.* **81(1)**, 31-40 (2002)
- [23] Azuma, Y., Ohura, K., Wang, P.-L., Shinohara, M.: Endomorphins 1 and 2 modulate chemotaxis, phagocytosis and superoxide anion production by microglia. *J. Neuroimmunol.* **119(1)**, 51-56 (2001)

- [24] Gong, J., Strong, J. A., Zhang, S., Yue, X., DeHaven, R. N., Daubert, J. D., Cassel, J. A., Yu, G., Mansson, E., Yu, L.: Endomorphins fully activate a cloned human mu opioid receptor. *FEBS Lett.* **439(1-2)**, 152-156 (1998)
- [25] Podlogar, B. L., Paterlini, M. G., Ferguson, D. M., Leo, G. C., Demeter, D. A., Brown, F. K., Reitz, A. B.: Conformational analysis of the endogenous  $\mu$ -opioid agonist endomorphin-1 using NMR spectroscopy and molecular modeling. *FEBS Lett.* **439(1-2)**, 13-20 (1998)
- [26] Fiori, S., Renner, C., Cramer, J., Pegoraro, S., Moroder, L.: Preferred conformation of endomorphin-1 in aqueous and membrane-mimetic environments. *J. Mol. Biol.* **291(1)**, 163-175 (1999)
- [27] Schwyzler, R.: ACTH: a short introductory review. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **297**, 3-26 (1977)
- [28] Yamazaki, T., Ro, S., Goodman, M., Chung, N. N., Schiller, P. W.: A topochemical approach to explain morphiceptin bioactivity. *J. Med. Chem.* **36(6)**, 708-719 (1993)
- [29] In, Y., Minoura, K., Ohishi, H., Minakata, H., Kamigauchi, M., Sugiura, M., Ishida, T.: Conformational comparison of  $\mu$ -selective endomorphin-2 with its C-terminal free acid in DMSO solution, by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy and molecular modeling calculation. *J. Pept. Res.* **58(5)**, 399-412 (2001)
- [30] Eguchi, M., Shen, R. Y. W., Shea, J. P., Lee, M. S., Kahn, M.: Design, synthesis and evaluation of opioid analogues with non-peptidic  $\beta$ -turn scaffold: Enkephalin and endomorphin mimetics. *J. Med. Chem.* **45(7)**, 1395-1398 (2002)
- [31] Keller, M., Boissard, C., Patiny, L., Chung, N. N., Lemieux, C., Mutter, M., Schiller, P. W.: Pseudoproline-containing analogues of morphiceptin and endomorphin-2: Evidence for a *cis* Tyr-Pro amide bond in the bioactive conformation. *J. Med. Chem.* **44(23)**, 3896-3903 (2001)
- [32] Bowen, J. P., Allinger, N. L.: Molecular mechanics: The art and science of parameterization. In *Reviews in Computational Chemistry*, Volume 2., (Eds: Lipkowitz, K. B., Boyd, D. B.), VCH Publishers, pp. 81-97 (1991)
- [33] Leach, A. R.: Molecular modelling. Principles and applications., *Chapter 4.: Empirical force field models: Molecular mechanics.*, Pearson Education Limited, pp. 165-252 (2001)
- [34] Pearlman, D. A., Case, D. A., Caldwell, J. W., Ross, W. S., Cheatham III, T. E., DeBolt, S., Ferguson, D., Seibel, G., Kollman, P.: AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules. *Comput. Phys. Commun.* **91(1-3)**, 1-41 (1995)

- [35] Brooks, B. R., Bruccoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S., Karplus, M.: CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J. Comput. Chem.* **4**(2), 187-217 (1983)
- [36] Momany, F. A., McGuire, R. F., Burgess, A. W., Scheraga, H. A.: Energy parameters in polypeptides. VII. Geometric parameters, partial atomic charges, nonbonded interactions, hydrogen bond interactions, and intrinsic torsional potentials for the naturally occurring amino acids. *J. Phys. Chem.* **79**(22), 2361-2381 (1975)
- [37] Scott, W. R. P., Hünenberger, P. H., Tironi, I. G., Mark, A. E., Billeter, S. R., Fennen, J., Torda, A. E., Huber, T., Krüger, P., van Gunsteren, W. F.: The GROMOS biomolecular simulation program package. *J. Phys. Chem. A* **103**(19), 3596-3607 (1999)
- [38] Jorgensen, W. L., Tirado-Rives, J.: The OPLS potential functions for proteins. Energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. *J. Am. Chem. Soc.* **110**(6), 1657-1666 (1988)
- [39] Schlick, T.: Optimization methods in computational chemistry. In *Reviews in Computational Chemistry*, Volume 3., (Eds: Lipkowitz, K. B., Boyd, D. B.), VCH Publishers, pp. 1-71 (1992)
- [40] Leach, A. R.: Molecular modelling. Principles and applications., *Chapter 5.: Energy minimisation and related methods for exploring the energy surface.*, Pearson Education Limited, pp. 253-302 (2001)
- [41] Brunel, Y., Faucher, H., Gagnaire, D., Rassat, A.: Programme de minimisation de l'énergie empirique d'une molécule par une méthode simpliciale. *Tetrahedron* **31**(8), 1075-1091 (1975)
- [42] Wiberg, K. B.: A scheme for strain energy minimization. Application to the cycloalkanes. *J. Am. Chem. Soc.* **87**(5), 1070-1078 (1965)
- [43] Fletcher, R., Reeves, C. M.: Function minimization by conjugate gradients. *Comput. J.* **7**(2), 149-154 (1964)
- [44] Polak, E., Ribiere, G.: Note sur la convergence de méthodes de directions conjuguées. *Rev. Fr. Inform. Rech. Oper.* **16**, 35-43 (1969)
- [45] Hestenes, M. R., Stiefel, E.: Methods of conjugate gradients for solving linear systems. *J. Res. Natl. Bur. Stand.* **49**, 409-436 (1952)
- [46] Powell, M. J. D.: Restart procedure for the conjugate gradient method. *Math. Program.* **12**, 241-254 (1977)
- [47] Dennis Jr., J. E., Moré, J. J.: Quasi-Newton methods, motivation and theory. *SIAM Rev.* **19**(1), 46-89 (1977)
- [48] van Gunsteren, W. F., Berendsen, H. J. C.: Computer simulation of molecular dynamics: Methodology, applications, and perspectives in chemistry. *Angew. Chem. Int. Edit.* **29**(9), 992-1023 (1990)



- [49] Leach, A. R.: Molecular modelling. Principles and applications., *Chapter 7.: Molecular dynamics simulation methods.*, Pearson Education Limited, pp. 353-409 (2001)
- [50] Verlet, L.: Computer „experiments” on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. *Phys. Rev.* **159**(1), 98-103 (1967)
- [51] Hockney, R. W.: The potential calculation and some applications. In *Methods in Computational Physics*, Volume 9., (Eds: Alder, B., Fernbach, S., Rotenberg, M.), Academic Press, New York/London, pp. 136-211 (1970)
- [52] Swope, W. C., Andersen, H. C., Berens, P. H., Wilson, K. R.: A computer simulation method for the calculation of equilibrium constants for the formation of physical clusters of molecules: Application to small water clusters. *J. Chem. Phys.* **76**(1), 637-649 (1982)
- [53] Beeman, D.: Some multistep methods for use in molecular dynamics calculations. *J. Comput. Phys.* **20**(2), 130-139 (1976)
- [54] Ryckaert, J.-P., Ciccotti, G., Berendsen, H. J. C.: Numerical integration of the Cartesian equations of motion of a system with constraints: Molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.* **23**(3), 327-341 (1977)
- [55] Andersen, H. C.: Rattle: A „velocity” version of the Shake algorithm for molecular dynamics calculations. *J. Comput. Phys.* **52**(1), 24-34 (1983)
- [56] Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. J. C., Fraaije, J. G. E. M.: LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem.* **18**(12), 1463-1472 (1997)
- [57] Andersen, H. C.: Molecular dynamics simulations at constant pressure and/or temperature. *J. Chem. Phys.* **72**(4), 2384-2393 (1980)
- [58] Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F., DiNola, A., Haak, J. R.: Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* **81**(8), 3684-3690 (1984)
- [59] Kirkpatrick, S., Gelatt, C. D., Vecchi, M. P.: Optimization by simulated annealing. *Science* **220**(4598), 671-680 (1983)
- [60] Leach, A. R.: A survey of methods for searching the conformational space of small and medium-sized molecules. In *Reviews in Computational Chemistry*, Volume 2., (Eds: Lipkowitz, K. B., Boyd, D. B.), VCH Publishers, pp. 1-55 (1991)
- [61] Saunders, M.: Stochastic exploration of molecular mechanics energy surfaces. Hunting for the global minimum. *J. Am. Chem. Soc.* **109**(10), 3150-3152 (1987)
- [62] Ferguson, D. M., Raber, D. J.: A new approach to probing conformational space with molecular mechanics: Random incremental pulse search. *J. Am. Chem. Soc.* **111**(12), 4371-4378 (1989)

- [63] Li, Z., Scheraga, H. A.: Monte Carlo-minimization approach to the multiple-minima problem in protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**(19), 6611-6615 (1987)
- [64] Chang, G., Guida, W. C., Still, W. C.: An internal coordinate Monte Carlo method for searching conformational space. *J. Am. Chem. Soc.* **111**(12), 4379-4386 (1989)
- [65] Cornell, W. D., Cieplak, P., Bayly, C. I., Gould, I. R., Merz, Jr., K. M., Ferguson, D. M., Spellmeyer, D. C., Fox, T., Caldwell, J. W., Kollman, P. A.: A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **117**(19), 5179-5197 (1995)
- [66] INSIGHT/DISCOVER, Biosym Technologies, Scranton Road, San Diego, CA, USA
- [67] SYBYL, Tripos Inc., 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA
- [68] Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., Klein, M. L.: Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **79**(2), 926-935 (1983)
- [69] Wang, J., Cieplak, P., Kollman, P. A.: How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *J. Comput. Chem.* **21**(12), 1049-1074 (2000)
- [70] Ramachandran, G. N., Ramakrishnan, C., Sasisekharan, V.: Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J. Mol. Biol.* **7**, 95-99 (1963)
- [71] Ramachandran, G. N., Sasisekharan, V.: Conformation of polypeptides and proteins. *Adv. Protein Chem.* **23**, 283-437 (1968)
- [72] Zimmerman, S. S., Pottle, M. S., Nemethy, G., Scheraga, H. A.: Conformational analysis of the 20 naturally occurring amino acid residues using ECEPP. *Macromolecules* **10**(1), 1-9 (1977)
- [73] Marshall, N. J., Grail, B. M., Payne, J. W.: Predominant torsional forms adopted by oligopeptide conformers in solution: Parameters for molecular recognition. *J. Pept. Sci.* **7**(4), 175-189 (2001)
- [74] Grail, B. M., Payne, J. W.: Predominant torsional forms adopted by dipeptide conformers in solution: Parameters for molecular recognition. *J. Pept. Sci.* **6**(4), 186-199 (2000)
- [75] Pal, D., Chakrabarti, P.: Conformational similarity indices between different residues in proteins and  $\alpha$ -helix propensities. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **18**(2), 273-280 (2000)
- [76] Chakrabarti, P., Pal, D.: The interrelationships of side-chain and main-chain conformations in proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **76**(1-2), 1-102 (2001)
- [77] Luke, B. T.: Displaying the structure of molecules by multidimensional plots of their torsion angles. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **33**(1), 135-142 (1993)

- [78] Becker, O. M.: Representing protein and peptide structures with parallel-coordinates. *J. Comput. Chem.* **18(15)**, 1893-1902 (1997)
- [79] Vass, E., Holly, S., Majer, Zs., Samu, J., Laczkó, I., Hollósi, M.: FTIR and CD spectroscopic detection of H-bonded folded polypeptide structures. *J. Mol. Struct.* **408/409**, 47-56 (1997)
- [80] Vass, E., Kurz, M., Konat, R. K., Hollósi, M.: FTIR and CD spectroscopic studies on cyclic penta- and hexa-peptides. Detailed examination of hydrogen bonding in  $\beta$ - and  $\gamma$ -turns determined by NMR. *Spectrochim. Acta A* **54(5)**, 773-786 (1998)
- [81] Venkatachalam, C. M.: Stereochemical criteria for polypeptides and proteins. V. Conformation of a system of three linked peptide units. *Biopolymers* **6(10)**, 1425-1436 (1968)
- [82] Lewis, P. N., Momany, F. A., Scheraga, H. A.: Chain reversals in proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **303(2)**, 211-229 (1973)
- [83] Nemethy, G., Printz, M. P.: The  $\gamma$  turn, a possible folded conformation of the polypeptide chain. Comparison with the  $\beta$  turn. *Macromolecules* **5(6)**, 755-758 (1972)
- [84] Rose, G. D., Gierasch, L. M., Smith, J. A.: Turns in peptides and proteins. *Adv. Protein Chem.* **37**, 1-109 (1985)
- [85] Alkorta, I., Suarez, M. L., Herranz, R., Gonzalez-Muniz, R., García-López, M. T.: Similarity study on peptide  $\gamma$ -turn conformation mimetics. *J. Mol. Model.* **2(1)**, 16-25 (1996)
- [86] Milner-White, E. J., Ross, B. M., Ismail, R., Belhadj-Mostefa, K., Poet, R.: One type of gamma-turn, rather than the other gives rise to chain reversal in proteins. *J. Mol. Biol.* **204(3)**, 777-782 (1988)
- [87] Milner-White, E. J.: Situations of gamma-turns in proteins, their relation to alpha-helices, beta-sheets and ligand binding sites. *J. Mol. Biol.* **216(2)**, 385-397 (1990)
- [88] Burley, S. K., Petsko, G. A.: Weakly polar interactions in proteins. *Adv. Protein Chem.* **39**, 125-189 (1988)
- [89] Bhattacharyya, R., Samanta, U., Chakrabarti, P.: Aromatic-aromatic interactions in and around  $\alpha$ -helices. *Protein Eng.* **15(2)**, 91-100 (2002)
- [90] Singh, J., Thornton, J. M.: The interaction between phenylalanine rings in proteins. *FEBS Lett.* **191(1)**, 1-6 (1985)
- [91] Brandl, M., Weiss, M. S., Jabs, A., Sühnel, J., Hilgenfeld, R.: C-H $\cdots$  $\pi$ -interactions in proteins. *J. Mol. Biol.* **307(1)**, 357-377 (2001)
- [92] Bhattacharyya, R., Chakrabarti, P.: Stereospecific interactions of proline residues in protein structures and complexes. *J. Mol. Biol.* **331(4)**, 925-940 (2003)



- [93] Burley, S. K., Petsko, G. A.: Aromatic-aromatic interaction: A mechanism of protein structure stabilization. *Science* **229(4708)**, 23-28 (1985)
- [94] Waters, M. L.: Aromatic interactions in model systems. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6(6)**, 736-741 (2002)
- [95] Pal, D., Chakrabarti, P.: *Cis* peptide bonds in proteins: Residues involved, their conformations, interactions and locations. *J. Mol. Biol.* **294(1)**, 271-288 (1999)
- [96] Gentilucci, L., Squassabia, F., Tolomelli, A.: Conformational analysis of cyclic endomorphin-1 analogues, molecular probes for investigating the bioactive structure of endomorphin-1-like agonists. *J. Med. Chem.* (in press)
  
- [I] Leitgeb, B., Ötvös, F., Tóth, G.: Conformational analysis of endomorphin-2 by molecular dynamics methods. *Biopolymers* **68(4)**, 497-511 (2003)
- [II] Leitgeb, B., Szekeres, A., Tóth, G.: Conformational analysis of endomorphin-1 by molecular dynamics methods. *J. Pept. Res.* **62(4)**, 145-157 (2003)
- [III] Leitgeb, B., Szekeres, A.: Exploring the conformational space of the  $\mu$ -opioid agonists endomorphin-1 and endomorphin-2. *J. Mol. Struct. - THEOCHEM* **666-667**, 337-344 (2003)
- [IV] Leitgeb, B., Tóth, G.: Aromatic-aromatic and proline-aromatic interactions in endomorphin-1 and endomorphin-2. *Eur. J. Med. Chem.* **40(7)**, 674-686 (2005)

## Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni:

**Dr. Tóth Géza** tudományos tanácsadónak, hogy lehetővé tette a doktori értekezésem elkészítését az MTA Szegedi Biológiai Központ Biokémiai Intézetében.

**Dr. Ötvös Ferenc** tudományos főmunkatársnak a kezdeti közös munkát.

**Szekeres András** tudományos segédmunkatársnak a közös munkát.

**Dr. Farkas Judit** tudományos munkatársnak és **Szemenyei Erzsébet** PhD hallgatónak a lelki támogatást.

**Dr. Bogár Ferenc** tudományos főmunkatársnak, **Dr. Rákhely Gábor** tudományos főmunkatársnak és **Kerényi Ádám** PhD hallgatónak a doktori értekezésemmel kapcsolatos hasznos javaslatokat és tanácsokat.

**Dr. Rákhely Gábor** tudományos főmunkatársnak, **Prof. Penke Botond** akadémikusnak és **Prof. Pongor Sándor** tudományos tanácsadónak, hogy a PhD ösztöndíjam lejártja után támogattak a munkám folytatásában.

**Prof. Ormos Pál** akadémikusnak és **Prof. Kovács Kornél** tudományos tanácsadónak, hogy tevékenységemet 2004 szeptemberétől az MTA Szegedi Biológiai Központ Biofizikai Intézetének égisze alatt folytathattam.